

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS DO ESCARRO  
INDUZIDO EM ADULTOS HÍGIDOS**

Florianópolis 2011

V476c Veras, Tiago Neves  
Características citológicas do escarro induzido em adultos  
hígidos [dissertação] / Tiago Neves Veras ; orientadora,  
Márcia Margaret Menezes Pizzichini. - Florianópolis, SC, 2011.  
54 p.: grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Médicas.

Inclui referências

1. Ciências médicas. 2. Escarro. 3. Inflamação das vias  
aéreas. I. Pizzichini, Márcia Margaret Menezes. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Médicas. III. Título.

CDU 61

N	27	61
CCT	3.5 ± 3.0	5.4 ± 4.6
Eosinófilos	0.2 ± 0.3	0.08 ± 0.3
Neutrófilos	26.7 ± 16.4	21.9 ± 13.2
Macrófagos	64.1± 15.1	70.3 ± 14.3
Linfócitos	3.8 ± 2.9	2.8 ± 2.4
Células bronco-epiteliais	4.9 ± 6.1	4.5 ± 5.2

\*media e desvio padrão

n = número

CCT = contagem celular total

Não foram enviadas imagens pelo autor (The author didn't send images)



Tiago Neves Veras

Caracaterísticas citológicas do escarro induzido em adultos hígidos

Dissertação apresentada para obtenção  
Do grau de Mestre em Ciências Médicas,  
Área de Concentração Pneumologia, da  
Universidade Federal de Santa Catarina

Orientador: Márcia M. Pizzichini

Florianópolis 2011

[http://www.jornaldepneumologia.com.br/sap/detalhe\\_simples.asp?cod\\_fluxo=2712&cod\\_versao=10352&ObjSubmissao=1](http://www.jornaldepneumologia.com.br/sap/detalhe_simples.asp?cod_fluxo=2712&cod_versao=10352&ObjSubmissao=1)

<b>Idade</b>	<b>18-29</b>	<b>30-39</b>	<b>40-49</b>	<b>≥50</b>
<b>n</b>	<b>39</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>24</b>
<b>CCT</b>	<b>4.1 ± 3.2</b>	<b>5.3 ± 4.3</b>	<b>5.2 ± 3.7</b>	<b>5.8 ± 5.6</b>
<b>Eosinófilos</b>	<b>0.1 ± 0.3</b>	<b>0.08 ± 0.3</b>	<b>0.2 ± 0.4</b>	<b>0.08 ± 0.3</b>
<b>Neutrófilos</b>	<b>20.2 ± 14.5</b>	<b>29.0 ± 14.8</b>	<b>28.1 ± 11.1</b>	<b>23.1 ± 14.8</b>
<b>Macrófagos</b>	<b>73.0 ± 14.8</b>	<b>62.3 ± 11.2</b>	<b>64.5 ± 10.6</b>	<b>66.0 ± 16.5</b>
<b>Linfócitos</b>	<b>3.1 ± 2.5</b>	<b>3.3 ± 2.5</b>	<b>3.0 ± 2.1</b>	<b>3.0 ± 2.6</b>
<b>Células bronco-epiteliais</b>	<b>4.3 ± 5.2</b>	<b>5.3 ± 4.4</b>	<b>4.2 ± 4.6</b>	<b>5.0 ± 6.0</b>

\*média e desvio padrão,

n = número

CCT = contagem celular total

Tabela 4. Contagem celular total e diferencial\* por atopia

Caso não esteja visualizando a tabela corretamente acesse a versão online clicando no link a seguir:

[http://www.jornaldepneumologia.com.br/sap/detalhe\\_simples.asp?cod\\_fluxo=2712&cod\\_versao=10352&ObjSubmissao=1](http://www.jornaldepneumologia.com.br/sap/detalhe_simples.asp?cod_fluxo=2712&cod_versao=10352&ObjSubmissao=1)

	<b>Atópico</b>	<b>Não-atópico</b>

CCT = contagem celular total

DP = desvio padrão

AIQ = amplitude do interquartil

Tabela 2. Contagem diferencial das células não escamosas

Caso não esteja visualizando a tabela corretamente acesse a versão online clicando no link a seguir:  
[http://www.jornaldepneumologia.com.br/sap/detalhe\\_simples.asp?cod\\_fluxo=2712&cod-versao=103528ObjSubmissao=1](http://www.jornaldepneumologia.com.br/sap/detalhe_simples.asp?cod_fluxo=2712&cod-versao=103528ObjSubmissao=1)

	Média ± DP	Mediana (AIQ)	Percentil 10%	Percentil 90%
Eosinófilos	0.1 ± 0.3	0 (0)	0	0.5
Neutrófilos	23.4 ± 14.3	21.7 (21.0)	6.9	41.3
Macrófagos	68.4 ± 14.7	71.0 (17.9)	47.9	86.0
Linfócitos	3.1 ± 2.4	3.0 (3.0)	0	6.5
Células bronco-epiteliais	5.2 ± 7.9	2.8 (4.9)	0.5	13.3

DP = desvio padrão

AIQ = amplitude do interquartil

Tabela 3. Contagem celular total e diferencial\* por faixa etária

Caso não esteja visualizando a tabela corretamente acesse a versão online clicando no link a seguir:

“Características citológicas do escarro induzido em adultos hígidos”  
POR

Tiago Neves Veras  
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador  
e membros da Comissão Examinadora

Orientador: \_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Márcia M.M. Pizzichini

Comissão Examinadora: \_\_\_\_\_  
Profª. Dra Tânia Silvia Frode

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr Roger Walz

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Cesar Fritscher

\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Márcia M. Menezes Pizzichini  
Coordenadora da Pós-graduação em Ciências Médicas  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, fevereiro de 2011

from asthmatic and from healthy subjects. Am Rev Respir Dis, 1993. 147 (5): p. 1126-31.

25. Nordenhall, C., et al., Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum. Eur Respir J, 2000. 15(6): p. 1046-51.

26. Burgess, J.L., et al., Acute changes in sputum IL-10 following underground exposure to diesel exhaust. Clin Toxicol (Phila), 2007. 45(3): p. 255-60.

**Tabela 1. Contagem celular total and diferencial ( $\times 10^6$ /g) no escarro induzido de indivíduos saudáveis**

Caso não esteja visualizando a tabela corretamente acesse a versão online clicando no link a seguir:

[http://www.jornaldepneumologia.com.br/sqp/detalhe\\_simples.asp?cod\\_fluxo=2712&cod\\_versao=1035280&Submissao=1](http://www.jornaldepneumologia.com.br/sqp/detalhe_simples.asp?cod_fluxo=2712&cod_versao=1035280&Submissao=1)

	Média $\pm$ DP	Mediana (AIQ)	Percentil 10%	Percentil 90%
<b>CCT</b>	<b>4.8 <math>\pm</math> 4.2</b>	<b>3.5 (4.0)</b>	<b>1.2</b>	<b>10.8</b>
<b>Eosinófilos</b>	<b>0.004 <math>\pm</math> 0.01</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0</b>	<b>0.02</b>
<b>Neutrófilos</b>	<b>1.4 <math>\pm</math> 2.1</b>	<b>0.9 (1.4)</b>	<b>0.1</b>	<b>3.0</b>
<b>Macrófagos</b>	<b>3.2 <math>\pm</math> 2.5</b>	<b>2.3 (3.0)</b>	<b>0.6</b>	<b>6.8</b>
<b>Linfócitos</b>	<b>0.1 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>0.09 (0.2)</b>	<b>0</b>	<b>0.3</b>
<b>Células bronco-epiteliais</b>	<b>0.1 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>0.1 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>0.01</b>	<b>0.3</b>

Society. Am J Respir Crit Care Med, 1995. 152(3): p. 1107-36.

16. Crapo, R.O., A.H. Morris, and R.M. Gardner, Reference spirometric values using techniques and equipment that meet ATS recommendations. Am Rev Respir Dis, 1981. 123(6): p. 659-64.

17. Juniper, E.F., Histamine and methacholine inhalation tests: a laboratory tidal breathing protocol. AB Draco, Lund, Sweden, 1991, 1991.

18. Pepys J., G.P.G.H., Coombs R.R.A., Lachmann P.J., Skin test in diagnosis. Clinical aspects of immunology. 1975. 3rd ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications: p. 55-80.

19. Simpson, J.L., et al., Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. Respirology, 2006. 11(1): p. 54-61.

20. Belda, J., et al., [Induced sputum in asthma: study of validity and repeatability]. Arch Bronconeumol, 1997. 33(7): p. 325-30.

21. Nobutomo, K., Air pollution and cytological changes in sputum. Lancet, 1978. 1(8063): p. 523-6.

22. Stenfors, N., et al., Different airway inflammatory responses in asthmatic and healthy humans exposed to diesel. Eur Respir J, 2004. 23(1): p. 82-6.

23. Nightingale, J.A., et al., Effect of inhaled endotoxin on induced sputum in normal, atopic, and atopic asthmatic subjects. Thorax, 1998. 53(7): p. 563-71.

24. Fahy, J.V., et al., Cellular and biochemical analysis of induced sputum

#### AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Tetelbon Stein pela confiança e oportunidades na Pneumologia Pediátrica

Ao Prof. Dr. Paulo José Cauduro Maróstica, eterno exemplo e parceiro

A Profa. Dra Márcia Margaret Menezes Pizzichini, Enfas. Cristiane, Maira e Nazaré e toda sua equipe do NUPAIVA pela paciência e cooperação.

Aos amigos Roberto Stelter, Mauricio Benetton, Hamilton Malfussi e Diego Djones Brandenburg pelo incentivo.

A todos os professores e mestres incentivadores ao longo do desenvolvimento do mestrado.

Reproducibility of Non-Eosinophilic Asthma Using Induced Sputum. *Respiration*, 2009.

7. Haldar, P., et al., Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008. 178(3): p. 218-24.

8. Moritz, P., et al., Determination of the inflammatory component of airway diseases by induced sputum cell counts: use in clinical practice. *J Bras Pneumol*, 2008. 34(11): p. 913-21.

9. Green, R.H., et al., Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*, 2002. 57(10): p. 875-9.

10. Jayaram, L., et al., Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. *Eur Respir J*, 2006. 27(3): p. 483-94.

11. Leigh, R., et al., Stable COPD: predicting benefit from high-dose inhaled corticosteroid treatment. *Eur Respir J*, 2006. 27(5): p. 964-71.

12. Belda, J., et al., Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. 161(2 Pt 1): p. 475-8.

13. Spanevello, A., et al., Induced sputum cellularity. Reference values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. 162(3 Pt 1): p. 1172-4.

14. Thomas, R.A., et al., The influence of age on induced sputum differential cell counts in normal subjects. *Chest*, 2004. 126(6): p. 1811-4.

15. Standardization of Spirometry, 1994 Update. American Thoracic



neutrófilos foi inferior a previamente relatada o que sugere que os valores de normalidade do escarro induzido podem variar de acordo com o local onde ele é amostrado.

30

31

32

### 33 REFERÊNCIAS

34

1. Pin, I., et al., Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*, 1992. 47(1): p. 25-9.
2. Vianna, E.O., Induced sputum cell counts in medical practice. *J Bras Pneumol*, 2008. 34(11): p. 889-90.
3. Pizzichini, E., et al., Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. 154(2 Pt 1): p. 308-17.
4. Efthimiadis, A., et al., Induced sputum cell and fluid-phase indices of inflammation: comparison of treatment with dithiothreitol vs phosphate-buffered saline. *Eur Respir J*, 1997. 10(6): p. 1336-40.
5. Brightling, C.E., et al., Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2000. 356(9240): p. 1480-5.
6. Simpson, J.L., P. McElduff, and P.G. Gibson, Assessment and

### RESUMO

Objetivo: determinar os valores de normalidade do escarro induzido de uma população de adultos saudáveis.

Métodos: o escarro induzido foi obtido de 88 adultos não tabagistas hígidos (39 homens) com idade média de 36 anos (variação, 18 a 68 anos). Devido à distribuição não gaussiana da contagem celular total e de alguns componentes celulares (eosinófilos e linfócitos) os resultados da citologia do escarro encontram-se expressos como média e desvio padrão, mediana, intervalo interquartil além dos Percentis (10 e 90). Diferenças entre grupos foram analisadas usando ANOVA ou teste *t* para amostras não pareadas. Foram considerados significativos os valores de *p* inferiores a 0.05.

Resultados: A contagem celular total foi de 4.8, 3.5 (10.8) x 10<sup>6</sup> cels/g [(média, IQR, p90)] e a viabilidade celular foi de 77.5, 79.0 (94)%. Houve predomínio de macrófagos 77.5, 71.0 (86)% e neutrófilos 23.4, 21.7 (41.3)%. Eosinófilos estiveram virtualmente ausentes (0.1, 0 (0.5)% no escarro induzido da maioria dos adultos saudáveis. Linfócitos (3.1, 3 (6.5) %) e células broncoepiteliais (0.1, 0 (0.5) %) foram escassas. Não houve influência estatisticamente significativa de sexo e atopia na celularidade do escarro.

Conclusões: nesta amostra de adultos voluntários hígidos, a proporção de neutrófilos no escarro induzido foi menor que a de estudos anteriores. Este achado pode ser devido a variações regionais na poluição do ar e sugere a necessidade de mais estudos para determinar as faixas normais de celularidade do escarro induzido da população brasileira

domiciliar ou ambiental passada. Porém, nenhum dos indivíduos estudados esteve exposto à poluição ambiental nos últimos dois anos.

<sup>27</sup> Exposição ambiental consiste em uma variedade de gases e partículas poluentes entre os quais a matéria particulada parece ser a mais nociva para a saúde humana. Inalações repetidas de partículas poluentes podem resultar em grau moderado de estresse oxidativo e resposta inflamatória nas vias aéreas e pulmões[21]. Nos últimos anos diversas pesquisas investigaram o efeito da exposição aguda e crônica dos pulmões à poluição ambiental. Estudos usando lavado broncoalveolar[22] ou escarro induzido demonstraram que indivíduos saudáveis expostos ao ozônio[23-25] ou diesel[25] apresentam uma resposta inflamatória caracterizada por aumento de neutrófilos e interleucina-6. As mudanças no escarro induzido podem ser observadas tão precocemente quanto seis horas após a exposição[22]. Além disso, tem sido demonstrado que trabalhadores saudáveis expostos diariamente a poluição produzida pelo tráfego apresentam neutrofilia no escarro[26]. Embora seja razoável assumir que a menor proporção de neutrófilos relatada no escarro induzido de nossa amostra possa estar associada a uma menor exposição à poluição ambiental é necessária a confirmação desta hipótese através de estudos especificamente destinados a investigar este aspecto.

<sup>28</sup> Finalmente, é importante mencionar que em 85% dos indivíduos deste estudo a proporção de eosinófilos no escarro induzido foi zero. Este resultado confirma relatos anteriores[12, 13] e suporta o conceito de que a eosinofilia no escarro é um marcador robusto e confiável de inflamação eosinofílica. Nossos resultados também sugerem que o ponto de corte atual de 3.0% para inflamação eosinofílica pode ser diminuído.

<sup>29</sup> Em suma, os resultados do presente estudo mostram que nesta população de indivíduos saudáveis os macrófagos e neutrófilos são as células predominantes no escarro induzido. Contudo a proporção de

## 23 DISCUSSÃO

24 O objetivo deste estudo foi determinar os valores de referência para o escarro induzido em uma amostra de brasileiros saudáveis que nunca fumaram e residentes em uma cidade não industrial. Nossos resultados são semelhantes aos previamente publicados na literatura demonstrando que o escarro de indivíduos saudáveis é caracterizado por uma predominância de macrófagos e neutrófilos com escassez de eosinófilos e linfócitos[12, 13] . Contudo, a proporção e o número absoluto de neutrófilos em nosso estudo foram menores que os previamente relatados. O conhecimento dos valores de referência da celularidade do escarro, em particular neutrófilos e eosinófilos, é importante para compreender e interpretar o significado dos subtipos inflamatórios neutrofílico, eosinofílico e paucigranulocítico os quais têm sido usados com frequência para fenotipar a asma[19].

25 A menor proporção de neutrófilos encontrada no presente estudo não pode ser atribuída a aspectos técnicos uma vez que a indução e o processamento do escarro foram similares aos utilizados nos estudos anteriores[12, 13, 20]. Também não parece ser devida a viés na seleção dos participantes uma vez que não encontramos efeito da idade ou de atopia na contagem celular total ou diferencial. Nós especulamos se esta menor proporção de neutrófilos pode ter sido causada por variações locais tais como poluição ambiental.

26 O presente estudo não foi desenhado para investigar o efeito da poluição ambiental nas secreções das vias aéreas. Ao contrário, este estudo foi concebido para determinar os valores normais do escarro induzido em adultos saudáveis não expostos à poluição ambiental uma vez que todos os participantes residiam por no mínimo dois anos em área cidade não industrial. Nós não podemos excluir com certeza exposição

## ABSTRACT

Objective: to determine the normal ranges of induced sputum of a healthy adult population

Methods: Induced sputum was obtained from 88 long-life nonsmokers healthy adults (39 men) with a mean age of 36 years (age range, 18 to 68 years) living in the past two years in a non-industrial area of a medium size Brazilian city. The results are expressed as mean, median (90th percentile). The knowledge of induced sputum normal ranges, particularly related to eosinophils and neutrophils, is essential to its applicability. Normal ranges for total and differential cell counts in induced sputum might be influenced by regional variations (ex. air pollution), age, atopy, and methods of induction and processing of sputum. Therefore, local ranges of induced sputum might be necessary.

Results: Total cell count was  $4.8, 3.5 (10.8) \times 10^6$  cells/g [(mean, IQR (90<sup>th</sup> percentile)] and cell viability was 77.5, 79.0 (94.0) %. There was a predominance of macrophages 77.5, 71.0 (86.0) % and neutrophils 23.4, 21.7 (41.3) %. Eosinophils were virtually absent (0.1, 0 (0.5) %) in the induced sputum of most of healthy subjects. Lymphocytes (3.1, 3 (6.5) %) and bronchial epithelial cells (0.1, 0 (0.5) %) were scarce. There was no effect of age or atopy on differential cell counts.

Conclusions: In this healthy volunteer population the proportion of neutrophils in induced sputum was lower than previous publications. This finding might be influenced by regional variations in air pollution and highlights the need for local normal ranges of induced cell counts.

gaussiana da contagem celular total e de alguns componentes celulares (eosinófilos e linfócitos) os resultados da citologia do escarro encontram-se expressos como média e desvio padrão, mediana, intervalo interquartil além dos percentis (10 e 90). Diferenças entre grupos foram analisadas usando ANOVA ou teste  $t$  para amostras não pareadas. Foram considerados significativos os valores de  $p$  inferiores a 0.05 e todos os testes foram bi-caudados. Os dados foram analisados através do pacote estatístico SPSS- *Statistical Package for the Social Sciences* para Windows, versão 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

19

## 20 RESULTADOS

21 A indução do escarro produziu uma amostra adequada em 88 participantes (39 homens), idade média 36 (18 a 68) anos. A taxa de sucesso da indução do escarro foi 88.9%. A qualidade do escarro obtido foi adequada conforme indicado por uma viabilidade média (DP), mediana (percentil de 90%) de 77.5 (11.1), 79.0 (94.0)%. A contagem da celularidade total e diferencial de células não escamosas, a distribuição dos eosinófilos e neutrófilos expressos em valor absoluto e percentual, assim como o limite superior de cada célula estão discriminados nas Tabelas 1 a 2 . Houve predomínio de macrófagos e neutrófilos. Eosinófilos estavam ausentes no escarro da maioria (85%) dos indivíduos. Havia poucos linfócitos e células epiteliais. Nós também examinamos a celularidade de acordo com a idade e a presença de atopia (Tabelas 3 e 4). Apesar da contagem de eosinófilos ser maior em indivíduos atópicos isto não foi clinicamente importante nem estatisticamente significativo. Não houve influência da idade na distribuição da celularidade total ou diferencial.

22

de alérgenos inalantes, um controle negativo (glicerol) e um controle positivo (histamina). O teste foi considerado positivo quando a pápula apresentou tamanho > 3 mm acima do controle negativo. Atopia foi definida como um ou mais testes positivos.

**16** O escarro foi induzido e processado pelo método descrito por Pizzichini *et al.*[3]. Resumidamente, o procedimento foi iniciado 15 minutos após a administração de 200 µg de salbutamol inalado, através da inalação de solução salina em concentrações crescentes de 3%, 4% e 5%, cada uma destas inalada por 7 minutos sucessivamente até a última concentração ou até uma queda do volume expirado no primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>) igual ou superior a 20% em relação ao valor basal. Para a nebulização da solução salina foi utilizado um nebulizador ultrasônico Fisoneb (*Fisons*, Pickering, Ontario, Canadá), com débito de 0,87 ml/minuto e partículas com diâmetro aerodinâmico de massa mediano de 5,58 µm. Após cada período de inalação, o VEF<sub>1</sub> foi medido para garantir a segurança do teste, sendo que a concentração da solução salina não era aumentada caso ocorresse uma queda do VEF<sub>1</sub> ≥ 10% em relação ao valor basal. As amostras obtidas foram consideradas adequadas se as contagens celular total e diferencial pudessem ser obtidas de uma amostra com pelo menos 50% de viabilidade celular e com uma contaminação por células escamosas da orofaringe inferior a 20%.

**17** **Análise Estatística**

**18** O tamanho da amostra foi estimado com base em cálculos prévios[12]. As variáveis categóricas (gênero, raça, atopia, sucesso na indução) estão representadas através de frequência absoluta e percentagens. As variáveis contínuas foram inicialmente avaliadas quanto a critérios de normalidade. As variáveis com distribuição contínua (idade, peso, altura, VEF<sub>1</sub> basal, VEF<sub>1</sub>/CVF, VEF<sub>1</sub> pós-salbutamol) estão expressas como média e desvio padrão ou valor mínimo e máximo. Devido à distribuição não

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....17  
LISTA DE TABELAS.....19  
LISTA DE ABREVIATURAS.....21

CAPÍTULO I

REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO.....23  
1.1 Aspectos históricos do escarro induzido.....23  
1.2 Aspectos metodológicos da técnica de indução do escarro ....25  
1.3 Comparações entre escarro espontâneo e induzido.....26  
1.4 Aspectos metodológicos da técnica de indução do escarro...26  
1.4.1 Nebulizadores.....26  
1.4.2 Concentração da solução salina.....26  
1.4.3 Segurança.....27  
1.4.4 Duração da Indução do escarro.....28  
1.4.5 Qualidade da amostra do escarro.....29  
1.4.6 Processamento do escarro induzido.....230  
1.5 Aplicabilidades do escarro induzido.....31  
  
2. JUSTIFICATIVA.....34  
3. OBJETIVOS.....35  
3.1.Objetivos gerais.....35  
3.2.Objetivos específicos.....35  
  
4. REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS.....36

CAPÍTULO II	
MÉTODOS	
2.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....42
2.2	LOCAL DO ESTUDO.....42
2.3	TAMANHO DA AMOSTRA.....42
2.4	PARTICIPANTES.....42
2.4.1	Critérios de inclusão.....43
2.4.2	Critérios de exclusão.....43
2.5	ASPECTOS ÉTICOS.....44
2.6	MEDIDAS E PROCEDIMENTOS.....44
2.6.1	Espirometria.....44
2.6.2	Teste Cutâneo.....45
2.6.3	Teste de broncoprovocação pela metacolina.....45
2.6.4	Indução do Escarro.....46
2.6.5	Processamento e análise do escarro.....46
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....47
2.8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....48
CAPÍTULO III	
RESULTADOS.....49	
CAPÍTULO IV	
DISCUSSÃO.....58	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....62	
CAPÍTULO V	
CONCLUSÕES.....64	

exposição ocupacional à poeira, químicos ou fumaças. Além disso, nenhum dos participantes havia tido sintomas de infecção respiratória nas últimas quatro semanas. Todos tinham espirometria normal (volume expiratório forçado no primeiro segundo ( $VEF_1$ ) > 80% do previsto, com uma razão entre  $FEV_1$  e capacidade vital forçada ( $VEF_1/CVF$ ) ≥ 80%) e responsividade normal à metacolina (concentração da metacolina para causar uma redução de 20% no  $VEF_1$  [ $PC_{20}$ ] > 8.0 mg/ml). Vinte e sete participantes eram atópicos conforme indicado pela presença de teste cutâneo positivo a um ou mais alérgenos comuns. O estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o ofício 084/84 e todos os voluntários assinaram termo de consentimento informado.

## 12 Delineamento do Estudo

13 Este foi um estudo transversal com uma única visita. Todos os indivíduos foram avaliados no laboratório de pesquisa do Núcleo de Pesquisa em Inflamação das Vias Aéreas (NUPAIVA), na UFSC. Após a verificação dos critérios de inclusão e exclusão, naqueles indivíduos com espirometria e metacolina normais foi induzido o escarro e realizado teste cutâneo para pesquisa de atopia.

## 14 Procedimentos

15 As características dos voluntários foram documentadas através de um questionário estruturado. As espirometrias foram realizadas de acordo com as especificações da *American Thoracic Society*[15]. Os valores de referência utilizados como previstos foram os de Crapo e cols.[16] . A broncoprovocação por metacolina foi realizada conforme o método descrito por Juniper e cols.[17] e os resultados expressos em unidades cumulativas de  $PC_{20}$ . Os testes cutâneos foram realizados utilizando uma técnica de puntura modificada[18] com utilização de 14 extratos comuns

escarro induzido obtidas devem ser balizadas com valores normais de referência.

4

5 Até o presente, apenas três estudos[12-14] determinaram os valores de referência para a contagem celular total e diferencial do escarro induzido usando uma amostra grande de indivíduos saudáveis. A única diferença entre os resultados destes estudos foi a proporção de neutrófilos.

6

7 Os valores de referência do escarro induzido podem ser influenciados por características regionais (tais como poluição do ar ambiente), atopia, idade, e métodos de indução e processamento do escarro. O objetivo do presente estudo foi o de determinar os valores de referência para a celularidade total e diferencial do escarro induzido de adultos saudáveis que nunca fumaram, residentes na cidade de Florianópolis.

8

9 **MÉTODOS**

10 **Participantes**

11 Um total de 99 adultos saudáveis, que nunca haviam fumado, residentes em Florianópolis (uma cidade não industrial, de tamanho médio localizada no sul do Brasil) por pelo menos dois anos, foram recrutados a partir de anúncios na mídia local e de cartazes na universidade. Nenhum deles tinha sintomas respiratórios nasais ou pulmonares, história atual ou passada de doenças respiratórias incluindo asma, rinite alérgica, ou

ANEXOS

Anexo 1. Aprovação pelo Comitê de Ética.....67  
Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....69  
Anexo 3. Artigo (*paper*) submetido.....72

Correspondência (Correspondence): Profa. Dra. Marcia MM Pizzichini Departamento de Clínica Médica Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC NUPAIVA – Hospital Universitário Campus Universitário – Trindade 88040-970 Florianópolis – SC - Brasil

Suporte Financeiro (Financial support):

Submetido para (Submitted for): Jornal Brasileiro de Pneumologia

Artigo numerado no SGP sob código de fluxo (The Article was numbered in SGP for the flux code): 2712

**1**

## **INTRODUÇÃO**

**2** A introdução do escarro induzido para avaliar a inflamação das vias aéreas há quase duas décadas[1, 2] proporcionou um grande avanço na compreensão da fisiopatologia das doenças das vias aéreas. No presente, existem evidências suficientes demonstrando que o escarro induzido é o método mais compreensivo para examinar a inflamação das vias aéreas de forma não invasiva por causa de suas propriedades de instrumento, ou seja, confiabilidade, reprodutibilidade e responsividade[3-5]. Além disto, os resultados de estudos recentes têm demonstrado de forma consistente que o escarro induzido é uma ferramenta importante para fenotipar a asma[6-8], a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)[7] e outras doenças das vias aéreas e, para estudar o efeito do tratamento nestas doenças[9-11]. Em contraste, poucos estudos examinaram a composição celular do escarro induzido em indivíduos saudáveis.

**3** O conhecimento dos valores normais das medidas no escarro induzido, particularmente no que se refere à proporção de eosinófilos e de neutrófilos, as duas células mais frequentemente utilizadas para caracterizar a resposta inflamatória das vias aéreas, é essencial para que se compreenda o resultado deste exame. A utilização do escarro induzido, associado com provas de função pulmonar, pode monitorar mais adequadamente o padrão de inflamação em condições respiratórias[12, 13]. Todavia, a contagem celular total e diferencial destas amostras de



Código de Fluxo: 2712

COMPOSIÇÃO DO ESCARRO INDUZIDO EM ADULTOS SAUDÁVEIS

INDUCED SPUTUM CELL COMPOSITION OF HEALTHY ADULTS

Autores (Authors)

**Tiago Neves Veras**: **Mestrando em Ciências Médicas pela Universidade Federal de Santa Catarina** - Pneumologista Infantil Hospital Jeser Amarante Faria  
**Emílio Pizzichini** : **Doutor em Pneumologia. Professor de Pneumologia da Universidade Federal de Santa Catarina e coordenador do NUPAIVA** - Título de especialista pela Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia  
**Leila John Marques Steidle** : **Doutora em Pneumologia** - Médica Pneumologista do Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina. Título de especialista pela Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia  
**Cristiane Cinara Rocha** : **Enfermeira pesquisadora do NUPAIVA** - Enfermeira  
**Pablo Moritz** : **Mestre em Ciências Médicas pela Universidade Federal de Santa Catarina** - Médico Pneumologista  
**Marcia Margarete Menezes Pizzichini** : **Doutora em Pneumologia** - Professora da disciplina de Clínica Médica da Universidade Federal de Santa Catarina

Descritores (Palavras-chave)

Escarro; Valores de Referência; Adulto

Keywords

Sputum; Reference Values; Adult Health

Resumo

Objetivo: neste estudo, nós examinamos a celularidade do escarro induzido em uma amostra de indivíduos adultos saudáveis. Métodos: escarro induzido foi obtido de 88 adultos saudáveis que nunca fumaram (39 homens) com idade média de 36 anos (18 a 68 anos) residindo nos últimos dois anos em Florianópolis, uma cidade brasileira não industrial e de tamanho médio. Os resultados estão expressos como média ± DP e mediana (percentil de 90%). Resultados: a contagem celular total foi de 4.8 ± 4.2, 3.5 (10.8) x 106 células/g. Houve proedomínio de macrófagos 77.5 ± 14.7, 71.0 (86.0) % e neutrófilos 23.4 ± 14.3, 21.7 (41.3)%. Eosinófilos estiveram virtualmente ausentes 0.1 ± 0.3, 0 (0.5) %) no escarro induzido da maioria dos indivíduos. A proporção de linfócitos e de células bronco-epiteliais foi pequena. Não houve efeito da idade ou de atopia sobre a contagem celular total ou diferencial. Conclusão: nesta população de indivíduos saudáveis os macrófagos e neutrófilos foram as células predominantes no escarro induzido. Contudo a proporção de neutrófilos foi inferior a previamente relatada o que sugere que os valores de normalidade do escarro induzido podem variar de acordo com o local onde ele é amostrado.

Abstract

Objective: we examined the cellularity of induced sputum of long-life non-smokers healthy adults of a southern non-polluted city of Brazil. Methods: induced sputum was obtained from 88 long-life nonsmokers healthy adults (39 men) with a mean age of 36 years (age range, 18 to 68 years) living in the past two years in a non-industrial area of a medium size Brazilian city. The results are expressed as mean ± SD, median (90th percentile). Results: total cell count was 4.8 ± 4.2, 3.5 (10.8) x 106 cells/g. There was a predominance of macrophages 77.5 ± 14.7, 71.0 (86.0) % and neutrophils 23.4 ± 14.3, 21.7 (41.3) %. Eosinophils were virtually absent 0.1 ± 0.3, 0 (0.5) %) in the induced sputum of most of healthy subjects. Lymphocytes and bronchial epithelial cells were scarce. There was no effect of age or atopy on differential cell counts. Conclusion: in this healthy volunteer population, macrophages and neutrophils were macrophages the predominant cells. However, the normal ranges for neutrophils in induced sputum were lower than previous publications. This might have been influenced by regional variations and highlights the need for local normal ranges

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Histograma da contagem celular total (CCT) no escarro induzido.....42

Figura 2. Histograma da contagem percentual de neutrófilos no escarro induzido.....43

Figura 3. Histograma da contagem do número de neutrófilos por grama de escarro induzido.....43

Figura 4. Histograma da contagem percentual de eosinófilos no escarro induzido.....44

Figura 5. Histograma da contagem do número de eosinófilos por grama de escarro induzido.....44

Figura 6. Histograma da contagem percentual de macrófagos no escarro induzido.....45

Figura 7. Histograma da contagem do número de macrófagos por grama de escarro induzido.....45

Figura 8. Histograma da contagem percentual de linfócitos no escarro.....46

Figura 9. Histograma da contagem do número de linfócitos por grama de escarro induzido.....46

**CONSENTIMENTO EM PARTICIPAR**

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim sobre o estudo “Celularidade do escarro induzido em adultos hígidos”.

Eu discuti com o Dr(a).\_\_\_\_\_ sobre minha decisão em participar neste estudo. Está claro para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação neste estudo é voluntária e isenta de despesas.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu atendimento neste serviço.

**Paciente:**

Nome do Paciente:

\_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

*Assinatura do Paciente*

\_\_\_\_\_

**OBS: Leve para casa, uma cópia deste termo assinado pelo seu médico**

**Médico**

Declaro que esclareci todos os propósitos do estudo, solucionei todas as dúvidas do paciente e obtive de forma apropriada e voluntária o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Nome do médico:

\_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

*Assinatura do médico*

\_\_\_\_\_

- Teste de broncoprovocação pela Metacolina: Este teste serve para determinar a sensibilidade de seus brônquios. Você realizará a espirometria antes e depois de receber uma nebulização com diferentes quantidades de metacolina.
- Indução do escarro:
- Teste alérgico cutâneo:

**RISCOS E DESCONFORTOS:**

Os testes a que você será submetido são procedimentos padronizados e utilizados corriqueiramente na prática médica, e em geral se associam com riscos insignificantes. O teste da metacolina e da inalação da solução salina podem causar sintomas leves de aperto no peito, chio ou tosse. Estes sintomas desaparecem rapidamente após o uso de um broncodilatador. Além disso, a inalação de solução salina para induzir o escarro pode ter gosto desagradável e provocar leve irritação na garganta, que desaparece logo após o teste. O teste de alergia é realizado na pele e, se for positivo, pode provocar coceira, inchaço e vermelhidão no local, como se fosse uma mordida de pernilongo.

Para a realização do questionário clínico e dos testes acima descritos, será necessário que você permaneça no centro do estudo por um período de até 2 (duas) horas. Após a realização dos testes você poderá exercer suas atividades rotineiras normalmente, sem nenhuma restrição.

**CONFIDENCIALIDADE**

Sua identidade, incluindo seu nome completo e as informações obtidas sobre você durante este estudo permanecerão confidenciais até onde possível por lei. No entanto, o médico do estudo e outros médicos ligados ao centro do estudo poderão revisar seus registros médicos e o formulário de consentimento. Os resultados deste estudo podem ser publicados em jornais científicos ou apresentados em encontros médicos, mas você não será identificado pelo nome.

**ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO**

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas deste hospital. Se você decidir participar, você deverá primeiramente assinar este Termo de Consentimento Informado declarando seu acordo em participar espontaneamente, e confirmando que você leu e entendeu todas as informações fornecidas neste termo.

É garantida a sua liberdade de se retirar deste estudo a qualquer hora que você desejar, sem causar nenhum prejuízo à continuidade do seu tratamento nesta instituição.

**CONTATOS**

O médico do estudo ou o pessoal do estudo responderá quaisquer perguntas que você tiver sobre este estudo e sobre os resultados dos testes que serão realizados. Entre em contato sempre que tiver qualquer dúvida sobre o estudo ou sua participação no mesmo.

**MÉDICO DO ESTUDO:** Dr Tiago Neves Veras

**TELEFONE:** (48) 3234-7711   NUPAIVA - Hospital Universitário  
(47) 8401 5773

Se você tiver alguma dúvida ou consideração sobre a ética desta pesquisa, entre em contato com:

**Comitê de Ética em Pesquisas (CEP)**

Cidade Universitária - Trindade  
Florianópolis / SC      CEP: 88040 - 900      Telefone: 3234-1755

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Características dos participantes.....40

Tabela 2. Citologia do escarro induzido, total e diferencial, em números absolutos.....41

Tabela 3. Citologia diferencial do escarro induzido expressa em percentual.....42

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PARTICIPANTE

**TÍTULO:** “Celularidade do escarro induzido em adultos hígidos.”

**MÉDICO DO ESTUDO:** Dr. Tiago Neves Veras.  
Hospital Universitário – UFSC  
Núcleo de pesquisa em asma e inflamação das vias aéreas – NUPAIVA

### INTRODUÇÃO:

Os pronomes “você” e “seu” referem-se ao participante do estudo em todo este formulário de consentimento. O objetivo deste formulário é dar a você informações sobre esta pesquisa. Você só deve participar deste estudo se desejar. Você pode se recusar a participar ou pode sair do estudo a qualquer momento sem qualquer penalidade. Assinando este formulário, você concorda em participar do estudo.

### OBJETIVO DESTE ESTUDO:

Você foi convidado a participar deste estudo por não ter nenhuma doença respiratória crônica e não fumar. O objetivo deste estudo é determinar as características das células do escarro de pessoas saudáveis da grande Florianópolis através do método da indução do escarro. Com isto, planeja-se obter os padrões da normalidade para este método na nossa região.

O método da indução de escarro já vem sendo utilizado por médicos e pesquisadores para o diagnóstico e tratamento de doenças das vias aéreas e dos pulmões há alguns anos. Entretanto, quando realizamos este procedimento em indivíduos doentes, comparamos os resultados obtidos com os resultados de estudos realizados com indivíduos normais em outros países. Ou seja, não temos parâmetros de comparação na nossa população para saber se os resultados representam a normalidade ou alguma alteração que possa indicar uma doença. Com a obtenção destes parâmetros da normalidade em nossa população local, o método de indução do escarro poderá ser utilizado de forma mais precisa tanto para a pesquisa científica quanto na prática médica, auxiliando no diagnóstico e tratamento de doenças como a asma, a bronquite, a tosse crônica, dentre outras.

### DESCRIÇÃO DO ESTUDO:

Este é um estudo que envolverá cerca de 100 pessoas com idade superior a 18 anos, residentes na grande Florianópolis. Estas pessoas não devem apresentar nenhuma doença respiratória crônica e nem tampouco estar fumando ou ter fumado no passado.

Sua participação no estudo consistirá em apenas uma visita ao centro de estudo, quando será realizado um questionário sobre sintomas respiratórios, assim como alguns exames complementares para excluir a presença de doenças respiratórias. Se estes testes forem normais, você será submetido então à indução do escarro, que é uma forma de induzir a produção de uma pequena quantidade de secreção das vias aéreas (escarro) para a posterior análise de suas células sob o microscópio.

### PROCEDIMENTOS DO ESTUDO:

Os seguintes procedimentos serão conduzidos durante sua visita ao NUPAIVA:

- Será pedido que você leia e assine este formulário de consentimento informado antes de serem realizados quaisquer testes ou procedimentos.
- Revisão das suas condições médicas atuais e passadas, incluindo o uso de quaisquer medicamentos.
- Exame físico, incluindo aferição de peso e altura.
- Espirometria: teste respiratório que requer que você respire em um tubo ligado a uma máquina que mede quanto ar você tem nos pulmões e sua capacidade de soprar o ar para fora.


- o documento não fornece explicações sobre o financiamento deste projeto e como não foi apresentado relatório do estudo anterior; questiona-se se este será custeado pelos próprios pesquisadores, uma vez que o orçamento é bastante elevado. O CEP alerta para que o Hospital Universitário, de caráter público, não seja onerado com os procedimentos necessários para desenvolvimento desse novo estudo e solicita confirmação da previsão orçamentária e relatório final do estudo realizado por Pablo Moritz.

- apresentar nova declaração de ciência do Hospital Universitário.

PARECER:

Pendente

Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado por este Comitê na data de 14 de dezembro de 2009.

  
Washington Portela de Souza  
Coordenador do CEP SH

Fonte: CONEP/ANVS - Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AD água destilada  
ATS American Thoracic Society  
C1 dezena do TCC ( $C1 \times 10^6/ml$ )  
CVF capacidade vital forçada  
DTT ditiotreitól  
EI escarro induzido  
ISAAC International Study of Asthma and Allergies in Childhood  
MGG May-Grumwald-Giemsa  
PBS Phosphate Buffered Saline  
RPM rotações por minuto  
TCC contagem total de células  
V1 volume filtrado  
V2 volume de PBS acrescentado ao precipitado  
VEF1 volume expiratório forçado em um segundo



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS**  
**PARECER CONSUBSTANCIADO - PROJETO Nº 084.04**

**I- Identificação:** Processo nº 084/04

**Título do Projeto:** Celularidade do escarro induzido em adultos hígidos

**Pesquisador Responsável:** Dr. Emílio Pizzichini (Dpto Clínica Médica/ Serviço de Pneumologia)

**Pesquisador Principal:** Dr. Pablo Moritz (Candidato ao Mestrado CM/UFSC)

**Data de apresentação ao CEP:** 05/04/2004

**Data da Coleta de Dados:** Maio de 2004 – outubro de 2005

**Instituição onde se realizará o estudo:** HU/NUPAIVA (Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das vias Aéreas)

**II- Objetivos:**

- Determinação dos valores de referência das contagens celulares e sua distribuição no escarro induzido, na população da Grande Florianópolis, de modo a permitir o uso do escarro induzido como uma ferramenta clínica e de pesquisa de uma forma mais precisa sem depender da utilização de valores da normalidade encontrados em outras populações.
- Detecção de possíveis doenças respiratórias assintomáticas através dos testes em indivíduos sem doença conhecida.
- Auxílio no diagnóstico e tratamento de doenças como a Asma, a Bronquite, a Tosse Crônica, dentre outras.

**III- Sumário do Projeto**

A identificação de marcadores biológicos que permitam o diagnóstico precoce, a monitoração e a otimização do tratamento das doenças pulmonares, especialmente as DPOC (doenças pulmonares obstrutivas crônicas) é um dos objetivos mais ambiciosos da medicina respiratória. Assim, é fundamental este estudo da indução do escarro para estudar as características da inflamação das vias aéreas na asma e em outras doenças respiratórias, por não ser invasivo. Trata-se de um estudo que envolverá 110 pessoas com idade superior a 18 anos, residentes na Grande Florianópolis, que não apresentam nenhuma doença respiratória crônica e nem sejam ou foram fumantes, excluindo-se indivíduos em tratamento contínuo e com a normalidade na espirometria ou no teste de broncoprovocação pela metacolina.

Constitui-se da inalação de solução salina isotônica ou hipertônica através de nebulização num desenho descritivo transversal. Todos os procedimentos do estudo serão realizados em uma única visita, procedendo-se:

- Anamnese (questionário de sintomas respiratórios)
- Espirometria (volume expirado no 1º segundo e capacidade vital reforçada)
- Teste de broncoprovocação pela metacolina
- Teste alérgico, cutâneo
- Indução de escarro.

O projeto tem previsto um custo de R\$ 28.160,00 (vinte e oito mil e cento e sessenta reais).

**IV- Comentários**

O projeto contempla um cuidado ético para com as questões dos riscos e desconfortos do estudo para o sujeito, as garantias de confiabilidade, de esclarecimentos permanentes e de liberdade quanto participação e permanência no estudo, bem como com o TCLE, que é esclarecedor para uma consciente adesão. Os procedimentos estão consoantes aos objetivos e preservam a questão da ética da pesquisa.

**V- Parecer:**

Aprovado

**VI- Data da Reunião:** 26 de abril de 2004

Em dezembro de 2009, cinco anos após aprovação no CEP, recebemos documento do coordenador do projeto solicitando substituição dos pesquisadores principal e responsável.

Tal documento informa que Tiago Neves Veras, mestrando de Medicina, assumirá o estudo sob orientação da Profª Marcia Margaret M. Pizzichini e com co orientação de Pablo Moritz. Este último deveria ter desenvolvido o projeto aprovado para sua dissertação de mestrado mas optou por outro estudo, comprometendo-se, neste momento, com a co orientação do atual pesquisador principal.

Os relatores não se opõem às mudanças desde que sejam esclarecidas algumas questões:

- que sejam mantidos os mesmos cuidados éticos em relação aos sujeitos da pesquisa, especialmente porque serão recrutados na comunidade (indivíduos hígidos). Apresentar plano para recrutamento desses sujeitos e obtenção do TCLE.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSÕES

1. Nesta população de indivíduos saudáveis os macrófagos e neutrófilos são as células predominantes no escarro induzido. O percentual de eosinófilos é muito baixo.
2. A proporção de neutrófilos foi inferior à previamente relatada o que sugere que os valores de normalidade do escarro induzido podem variar de acordo com o local onde ele é amostrado.
3. Não houve diferença significativa na contagem celular e no percentual do escarro induzido entre as faixas etárias estudadas.
4. Não houve diferença significativa na contagem celular e no percentual do escarro induzido com relação à presença de atopia.
5. A taxa de sucesso na indução do escarro induzido foi elevada.

## CAPÍTULO I

### REFERENCIAL TEÓRICO

#### 1. INTRODUÇÃO

A obtenção de secreções das vias aéreas através de métodos não invasivos tem permitido um grande avanço na compreensão da fisiopatologia das doenças respiratórias. No presente, existem evidências suficientes demonstrando que o exame do escarro induzido é o método mais compreensivo para o estudo da inflamação das vias aéreas (1-3). Além disso, tem sido extensamente comprovado que o exame do escarro induzido é um instrumento bem padronizado (4, 5), confiável (6), reprodutível (1, 7) e responsivo às intervenções terapêuticas (8, 9). Mais ainda, os resultados de estudos recentes têm consistentemente demonstrado que o escarro induzido é uma ferramenta importante para caracteriza a asma (2, 10), a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (11) e outras doenças das vias aéreas (12, 13) e que isto pode ser importante em relação ao manejo destas condições (14). Em contraste, existem poucos estudos que estudaram a composição do componente celular do escarro induzido em indivíduos saudáveis.

#### 1.1. Aspectos históricos do escarro induzido

A utilização do escarro induzido através da inalação de um aerossol de solução salina foi inicialmente descrito por Bickerman *et al* (15) para diagnóstico de câncer de pulmão no final dos anos sessenta. Contudo, o uso de escarro induzido para o estudo da inflamação das vias aéreas foi introduzido apenas em 1993 por Pin e cols. (16). Embora se soubesse há décadas que o escarro produzido espontaneamente por asmáticos continha numerosos eosinófilos (16, 17), até então, o exame do escarro para avaliar a inflamação das vias aéreas era pouco empregado por ser considerado pouco reprodutível e pela dificuldade de ser obtido de forma espontânea na maioria dos pacientes (18, 19).

A partir da introdução do método de indução do escarro por Pin *et al*. (16) no estudo da inflamação das vias aéreas na asma, houve um grande interesse no refinamento, padronização e validação do exame das secreções obtidas pela indução. Na metade da década de 90 dois métodos distintos de processamento do escarro foram validados. Um deles utilizava o expectorado separado da saliva (20) e o outro usava o expectorado total (17). Os resultados destes dois estudos demonstraram que ambos os métodos eram reprodutíveis, válidos e discriminativos,

embora a reprodutibilidade e o sinal dos marcadores da fase líquida fossem superiores no método usando o expectorado selecionado da saliva (20). Desde então, observou-se um crescimento rápido no número de artigos nos quais os pesquisadores têm usado o escarro induzido para estudar os aspectos da inflamação das vias aéreas, inicialmente priorizando a asma, e mais recentemente estendendo a pesquisa para a DPOC e outras doenças respiratórias.

Atualmente, o método de indução e do processamento de escarro está refinado, validado e padronizado (21, 22), proporcionando uma forma segura e não-invasiva de coleta de material das vias aéreas inferiores, o qual pode levar à identificação de marcadores biológicos de potencial utilidade clínica na medicina respiratória.

### 1.2. Escarro induzido versus escarro espontâneo

A inalação de solução salina isotônica ou hipertônica por nebulização ultrassônica tem demonstrado a capacidade de induzir uma pequena quantidade de secreção das vias aéreas que pode ser expectorada e analisada. Acredita-se que o aumento da osmolaridade da camada de fluido que recobre as vias aéreas aumenta a permeabilidade vascular na mucosa brônquica e induz a produção de muco pelas glândulas submucosas (23, 24).

Sabe-se que o escarro produzido espontaneamente por alguns pacientes com asma e DPOC contém percentagens similares de células e mediadores inflamatórios em relação ao escarro induzido (2, 25). Observa-se, entretanto, que a viabilidade celular no escarro espontâneo é consideravelmente menor que no escarro induzido e que a qualidade das amostras é inferior, particularmente em pacientes com asma mais acentuada (2, 26).

Os pacientes em exacerbação de asma ou DPOC produzem escarro espontaneamente. Tanto mediadores inflamatórios como constituintes celulares têm concentrações semelhantes no escarro induzido e no escarro espontâneo. Todavia, as amostras obtidas por escarro induzido são de melhor qualidade, facilitando a visualização das células e aumentando a acurácia do exame (19, 27).

### 1.3. Segurança do escarro induzido

O escarro induzido apresenta diversas vantagens sobre os métodos invasivos de obtenção de material das vias aéreas inferiores (como por exemplo, a broncoscopia). A segurança e a praticidade são as mais importantes. O método para induzir escarro é relativamente não-

noninvasive tool in epidemiologic studies on air pollution and asthma. *Free Radic Biol Med*, 1999. **27**(11-12): p. 1448-54.

11. Saldiva, P.H., et al., Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **165**(12): p. 1610-7.
12. Nobutomo, K., Air pollution and cytological changes in sputum. *Lancet*, 1978. **1**(8063): p. 523-6.
13. Fahy, J.V., et al., Analysis of induced sputum after air and ozone exposures in healthy subjects. *Environ Res*, 1995. **70**(2): p. 77-83.
14. Lewis, J.A., et al., Proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid: effect of acute exposure to diesel exhaust particles in rats. *Environ Health Perspect*, 2007. **115**(5): p. 756-63.
15. Nordenhall, C., et al., Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum. *Eur Respir J*, 2000. **15**(6): p. 1046-51.
16. Liu, Q.Q., et al., Induced sputum eosinophil count for the diagnosis of bronchial asthma. *Saudi Med J*, 2010. **31**(6): p. 710-2.
17. Alvarez, M., et al., [Eosinophils in induced sputum versus nitric oxide in exhaled air: clinical utility in bronchial asthma.]. *An Sist Sanit Navar*, 2009. **32**(2): p. 217-25.
18. O'Byrne, P.M. and M.D. Inman, Induced sputum to assess airway inflammation in asthma. *Eur Respir J*, 1996. **9**(12): p. 2435-6.
19. Gibson, P.G., Use of induced sputum to examine airway inflammation in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1998. **102**(5): p. S100-1.
20. Kips, J.C., et al., The use of induced sputum in clinical trials. *Eur Respir J Suppl*, 2002. **37**: p. 47s-50s.



## REFERÊNCIAS

1. Belda J, Leigh R, Parameswaran K, et al. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:475–478
2. Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, et al. Induced sputum cellularity. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1172–1174
3. Thomas RA, Green RH, Brightling CE, Birring SS, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. The Influence of Age on Induced Sputum Differential Cell Counts in Normal Subjects. *Chest* 2004;126:1811-1814.
4. Holz, O., et al., Changes in sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy*, 1998. **28**(3): p. 284-92.
5. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology* 2006; 11:54–61.
6. Drews, A.C., et al., Neutrophilic airway inflammation is a main feature of induced sputum in nonatopic asthmatic children. *Allergy*, 2009. **64**(11): p. 1597-601
7. Liu, Q.Q., et al., Induced sputum eosinophil count for the diagnosis of bronchial asthma. *Saudi Med J*, 2010. **31**(6): p. 710-2.
8. Alvarez, M., et al., [Eosinophils in induced sputum versus nitric oxide in exhaled air: clinical utility in bronchial asthma.]. *An Sist Sanit Navar*, 2009. **32**(2): p. 217-25.
9. Boorsma, M., et al., Repeatability of inflammatory parameters in induced sputum of COPD patients. *COPD*, 2007. **4**(4): p. 321-9.
10. Hiltermann, J.T., et al., Ozone-induced inflammation assessed in sputum and bronchial lavage fluid from asthmatics: a new

invasivo podendo ser empregado de forma aleatória (28) e repetida em indivíduos com limitação ao fluxo de ar leve, moderada ou grave (29, 30) ou mesmo nas exacerbações das doenças das vias aéreas (31).

O processo de indução em voluntários e pacientes apresenta baixo risco e pode ser realizado mesmo naqueles com graus leves de limitação ao fluxo aéreo (29, 32). Naqueles pacientes com graus maiores de obstrução ao fluxo de ar, pode-se realizar um procedimento modificado, garantindo assim a segurança do mesmo (33). Não existem relatos de admissão hospitalar ou morte durante a indução de escarro seja em voluntários ou em pacientes com diferentes morbididades.

### 1.4. Aspectos metodológicos da técnica de indução do escarro

#### 1.4.1. Nebulizadores

Os nebulizadores ultrassônicos são recomendados por serem capazes de gerar débito adequado de solução salina, atingindo taxas de sucesso de até 92% (28, 34).

#### 1.4.2. Concentração da solução salina

As nebulizações podem ser realizadas com soluções de concentrações crescentes (inicialmente em 3%, progressivamente alcançando 5%) (35) ou com a mesma concentração durante todo o período de indução (16, 36). Métodos modificados para aumentar a segurança do procedimento em pacientes portadores de asma grave ou de exacerbações utilizam solução salina isotônica (37). Embora a composição celular das amostras de escarro obtidas não seja alterada pela concentração da solução salina [37] a taxa de sucesso com soluções hipertônicas é maior.

#### 1.4.3. Segurança

A nebulização com solução salina hipertônica pode desencadear algum grau de broncoconstrição (24, 38) a qual é prontamente revertida com o uso de um broncodilatador de curta ação (29, 39). Por isto, recomenda-se o pré-tratamento com salbutamol como rotina na indução do escarro (40). Porém, mesmo com este tratamento, ainda assim existe a possibilidade de broncoconstrição.

A segurança da indução do escarro é garantida pela realização de uma espirometria completa antes do procedimento seguindo-se de pré-tratamento com um broncodilatador (em geral salbutamol). Após cada período de inalação realiza-se uma espirometria e, caso o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>) apresente queda superior a 20% do valor basal o processo de indução pode ser finalizado

ou interrompido para a administração de outra dose de broncodilatador. A indução poderá ser reiniciada se os valores de VEF<sub>1</sub> retornarem a 90% dos valores basais (16, 41).

A influência do tratamento prévio com agonistas  $\beta_2$  sobre os constituintes celulares do escarro induzido foi investigada em alguns estudos (42), os quais não demonstraram efeitos do salbutamol sobre as contagens celulares. Jones e colaboradores compararam as técnicas de indução de escarro com e sem inalação prévia de salbutamol (43). A utilização de salbutamol pode alterar as concentrações de citocinas nos níveis de marcadores inflamatórios, como já demonstrado em modelos experimentais (44).

Finalmente, a segurança da indução do escarro pode ser aumentada em pacientes portadores de limitação severa ao fluxo de ar das vias aéreas ou de exacerbações moderadas a graves de asma pelo uso de solução salina isotônica e da verificação do VEF<sub>1</sub> a cada período de um a dois minutos pós- nebulização (37).

#### 1.4.4. Duração da indução do escarro

A duração total da indução do escarro pode ser vista de duas formas: duração de cada período de indução e duração total da indução. A duração de cada período varia de acordo com os diferentes estudos. Em geral, a indução do escarro é dividida em períodos consecutivos de cinco (45), ou sete minutos (46) após os quais é realizada a espirometria de segurança.

A duração total da indução do escarro pode influenciar a celularidade do escarro induzido (45) e a concentração dos marcadores da fase líquida (43). Períodos mais longos de nebulização fornecem amostras mais representativas de vias aéreas inferiores, com predomínio de macrófagos alveolares. Períodos mais curtos se traduzem em escarro de vias aéreas mais proximais, com predomínio de eosinófilos e neutrófilos (47).

Os estudos anteriores ressaltam a importância de padronizar o tempo de indução do escarro (41). Cita-se ainda a importância de se registrar sempre a duração do procedimento para comparação com outros estudos. Além disso, é importante manter constante a duração total da indução do escarro dentro de um mesmo estudo e entre estudos para que se possam comparar os resultados. Isto é particularmente importante para os estudos pré e pós- intervenção pelo qual os resultados podem ser falsamente alterados por tempos diferentes de indução (46).

Embora atopia tenha sido encontrada em quase um terço da nossa amostra não houve diferenças significativas na proporções e número total de indivíduos com ou sem atopia. Em seu estudo, Belda *et al* [1], demonstraram influência positiva da atopia e do sexo feminino no percentual de eosinófilos, porém em pequena magnitude.

Uma amostra satisfatória de escarro induzido foi obtida em quase 90% dos adultos elegíveis para o estudo, sem intercorrências graves registradas. Estes dados refletem a segurança deste método, bem como sua aplicabilidade e caráter não invasivo (79).

Em suma, os resultados do presente estudo mostram que nesta população de indivíduos saudáveis os macrófagos e neutrófilos são as células predominantes no escarro induzido. Contudo a proporção de neutrófilos foi inferior a previamente relatada o que sugere que os valores de normalidade do escarro induzido podem variar de acordo com o local onde ele é amostrado.

Nosso estudo não foi concebido para investigar o efeito da poluição ambiental nas secreções de vias aéreas. Ao contrário, o objetivo principal era determinar os valores de referência em adultos hígidos teoricamente não expostos à poluição. Sendo assim, os voluntários necessitavam residir há pelo menos 2 anos numa área não industrial de uma cidade brasileira de médio porte. Não se pode excluir que os mesmos em algum momento da vida tenham sido expostos a poluentes ambientais ou ocupacionais, mas certamente não se encontravam quando foram objetos da pesquisa.

Inalações repetidas de partículas do ar ambiente podem resultar em graus variados de stress oxidativo pulmonar e inflamação (68, 69). Nos últimos anos muitos estudos avaliaram os efeitos agudos e crônicos da exposição ambiental à poluição na saúde pulmonar (70, 71). Estudos com Lavado Bronco-alveolar (72) e escarro induzido (73) demonstraram que em resposta ao ozônio ou diesel indivíduos saudáveis apresentavam concentrações elevadas de neutrófilos e interleucina-6. Embora pareça razoável assumir que a poluição ambiental possa ser um fator de influência na composição das células do escarro induzido em adultos hígidos, faz-se necessário mais estudos nesta área.

Em nossa amostra o percentual de eosinófilos foi virtualmente ausente. Belda [1], em trabalho realizado na cidade industrial de Hamilton, encontrou percentual de eosinófilos de  $0,4\% \pm 0,5$ . Já Spanevello e cols.[2], em estudo realizado em Tradate, cidade da região da Lombardia, encontrou  $0,6\% \pm 0,8$  para o percentual de eosinófilos. Os resultados destes estudos, em concordância com nossa amostra, reafirmam o conceito que o percentual de eosinófilos no escarro induzido é um marcador consistente de inflamação eosinofílica da via aérea. Sugerem ainda que o ponto de corte atual de 3% para inflamação eosinofílica pode ser reduzido posteriormente. A faixa superior de normalidade no percentual de eosinófilos reveste-se de importância na medida em que pode servir de marcador inflamatório das vias aéreas inferiores (10, 34, 74-78).

Os resultados do presente estudo não mostraram influência da idade na contagem celular total e diferencial e diferencial do escarro induzido. Em contraste, Thomas *et al.* [3] em um estudo com adultos normais encontraram um aumento progressivo e significativo no percentual de neutrófilos em idades mais avançadas, acima de 60 anos. Para os autores deste estudo as explicações possíveis seriam a dificuldade em incluir idosos realmente saudáveis, dificuldade em detectar condições subclínicas ou mesmo alterações no sistema imune destes pacientes relacionadas com a idade avançada.

#### 1.4.5. Qualidade da amostra do escarro

O objetivo na padronização da indução é obter uma amostra adequada e reprodutível. Em sua composição, o escarro apresenta elementos celulares (macrófagos, eosinófilos e neutrófilos) e marcadores mensuráveis na fase líquida. Em sua coleta, invariavelmente há contaminação com saliva, a qual é rica em células escamosas e bactérias da orofaringe. A presença em grande quantidade destas células pode comprometer a visualização e a contagem celular no processamento do escarro (41). Para minimizar a contaminação, recomenda-se ao paciente lavar a boca com água e assoar o nariz antes de cada etapa da indução.

Após o processamento, considera-se adequada a amostra que contiver uma contaminação com células escamosas inferior a 20% (16, 22, 48), viabilidade celular superior a 50% (49-51) e possibilidade de analisar pelo menos 400 células (6).

#### 1.4.6. Processamento do escarro induzido

Para assegurar a viabilidade da amostra, esta deverá ser processada dentro de duas horas após sua coleta devendo ser conservada a  $4$  a  $8^{\circ}\text{C}$  (48, 52).

Caso seja necessário, a amostra pode ser processada em até 9 horas, desde que acondicionada a  $-4^{\circ}\text{C}$  (7). Das técnicas desenvolvidas para o processamento, tem-se dado preferência para aquela que seleciona, utilizando-se um microscópio invertido, os “*plugs*” ou porções mais densas da amostra. Selecionando o escarro promove-se menor contaminação por saliva.

Após esta etapa, o escarro é então depositado em um tubo de poliestireno de 15 ml (tubo de Falcon), onde é tratado com ditiotretol (DTT) a 0.1% (sputolysin 10%, Calbiochen Corp, San Diego, CA) em quatro vezes seu volume, misturando-se delicadamente o conteúdo com o auxílio de pipeta de Pasteur.

O tubo é colocado em um agitador de mesa (3D Rocking Plattform STR9), sendo seu conteúdo homogeneizado por mais 30 minutos. Após este período, adiciona-se PBS (Phosphate Buffered Saline), em quatro vezes o volume inicial do escarro, seguido por mais cinco minutos de homogeneização. A suspensão resultante é filtrada utilizando-se um filtro de nylon (Milipore 60 mcm). Parte desta suspensão era utilizada para cálculo de contagem de células (TCC, expressa na unidade  $\times 10^9/\text{ml}$ ) e também da viabilidade celular (método de exclusão do Azul de Tripán). O volume restante é centrifugado e o sobrenadante armazenado em um tubo de Eppendorf a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O precipitado é resuspenso em PBS e homogeneizado até que esteja

completamente disperso no PBS. Setenta a 80 mL desta suspensão (ajustada para  $1,0 \times 10^6/\text{mL}$ ) são colocadas em cada citospina (Eppendorf Citocentrífuge 5417C<sub>2</sub>), sendo centrifugados a 500 r.p.m. por 5 minutos. Quatro citospinas codificadas são preparadas para cada voluntário sendo fixadas com metanol e coradas pelo método de May-Grumwald-Giemsa.

São contadas 400 células não-escamosas e o citológico diferencial foi expresso pela percentagem de cada variável (eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células broncoepiteliais) sobre as 400 células contadas. Neste protocolo foram aceitas somente amostras de escarro com viabilidade celular superior a 50% e menos de 20% de células escamosas.

### 1.5. Aplicabilidade do escarro induzido

Pelo conhecimento atual, o número e a percentagem de eosinófilos permanecem sendo a informação mais importante obtida da análise do escarro, particularmente na asma e na DPOC. Durante infecções respiratórias e em pacientes com DPOC, a contagem total de células por mililitro de escarro e a proporção de neutrófilos também podem fornecer informações relevantes (14).

Na asma, observa-se que até 80% dos pacientes virgens de tratamento (21, 53) e mais de 50% dos pacientes em tratamento com corticosteróides, (54, 55), porém ainda sintomáticos, têm uma contagem de eosinófilos elevada no escarro. A validade de uma contagem elevada de eosinófilos para o diagnóstico de asma é melhor que a resposta imediata ao broncodilatador e que as medidas de variabilidade do pico de fluxo expiratório, com sensibilidade e especificidade se aproximando daquelas observadas nos testes que quantificam a responsividade brônquica (32). Observa-se que pacientes com contagem de eosinófilos no escarro < 3% apresentam pouca evidência de melhora clínica e funcional quando submetidos ao tratamento com corticosteróides inalados (56). Estes achados sugerem que a avaliação da inflamação subjacente pode guiar melhor o tratamento em relação à necessidade do uso de corticosteróides, do que a avaliação das anormalidades funcionais.

Além de auxiliar na dose e no tratamento adequado, alguns estudos sugerem que a monitorização da concentração de eosinófilos do escarro pode antecipar as exacerbações de crises asmáticas (57, 58). Outro aspecto de contribuição do escarro induzido consiste na identificação do predomínio de neutrófilos em pacientes com asma grave ou fenótipos não relacionados à eosinofilia (48, 59)

## CAPÍTULO IV

### DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram um predomínio de macrófagos e de neutrófilos no escarro induzido de adultos hígidos residentes em Florianópolis. A presença de eosinófilos foi infrequente. Estes resultados estão de acordo com os dados de estudos internacionais anteriores [1-3]. Contudo, a contagem total e relativa dos neutrófilos foi inferior ao relatado previamente o que sugere que, pelo menos para esta célula, valores locais são necessários. Além disto, este achado também é importante em relação à caracterização de inflamação em neutrofílica ou paucineutrofílica [1,4,5].

Este é o primeiro estudo a determinar os valores de referência para a celularidade do escarro induzido em amostra de adultos de Florianópolis. Os valores de normalidade obtidos em nosso estudo são importantes, mas podem ter sua aplicabilidade limitada devido às características ambientais de nossa cidade e do método de processamento do escarro usado neste estudo. Pesquisas que utilizem metodologia diferente na indução do escarro, tais como utilização da amostra de escarro e saliva associados ou com tempo de indução diferente podem chegar a valores muito diferentes na TCC e na celularidade do escarro.

A presença majoritária de macrófagos associada à detecção de células bronco-epiteliais no escarro induzido indica sua origem nas vias aéreas inferiores. A origem da amostra do escarro induzido tem reflexo direto no padrão de celularidade do mesmo. Holz e cols. (45) demonstraram diminuição significativa da proporção de neutrófilos e aumento concomitante de macrófagos em adultos asmáticos e saudáveis ao comparar amostras de escarro induzido coletadas sucessivamente. O percentual de eosinófilos não foi influenciado neste estudo.

A baixa proporção de neutrófilos encontrada em nosso estudo não pode ser atribuída exclusivamente às técnicas utilizadas na indução ou no processamento, tendo em vista que as mesmas foram similares a estudos anteriores (52, 61, 67). Especula-se se características regionais tais como poluição do ar possam ter alguma interferência nestas proporções uma vez que se sabe que em cidades industrializadas a poluição ambiental pode contribuir para o aumento no número de macrófagos e de neutrófilos [7-9].

A Tabela cinco mostra a contagem celular total e diferencial (expressa em percentual) de acordo com a presença ou ausência de atopia. Embora o percentual de eosinófilos tenha sido maior nos portadores de atopia esta diferença não foi estatisticamente significativa ou clinicamente importante ( $p>0.05$ ).

Tabela 5. Contagem celular total e diferencial\* no escarro induzido de acordo com a presença e ausência de atopia

	Atópico	Não atópico
n	27	61
CCT x10 <sup>6</sup> /g	3.5 ± 3.0	5.4 ± 4.6
Eosinófilos	0.2 ± 0.3	0.08 ± 0.3
Neutrófilos	26.7 ± 16.4	21.9 ± 13.2
Macrófagos	64.1 ± 15.1	70.3 ± 14.3
Linfócitos	3.8 ± 2.9	2.8 ± 2.4
Células broncoepiteliais	4.9 ± 6.1	5.4 ± 8.6

\*Valores expressos como média e desvio padrão

CTT = Contagem celular total

Na DPOC, a contagem dos neutrófilos no escarro está freqüentemente aumentada e se relaciona com a redução no volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1), sugerindo que a inflamação neutrofílica é funcionalmente importante (60). Até 40% dos pacientes com DPOC apresentam uma contagem elevada de eosinófilos no escarro (60). Existem hoje evidências crescentes de que a presença de eosinofilia no escarro de pacientes com DPOC é capaz de prever uma resposta objetiva ao tratamento com corticosteróides (60, 61).

Nas pneumonias da comunidade o escarro induzido pode desempenhar papel de destaque, principalmente em crianças e em indivíduos HIV positivo (13). Nestas condições, seria possível a coleta de material para diagnóstico microbiológico e programação de tratamento (62), possibilitando melhor terapêutica e redução de custos com medicações.

Tanto a asma quanto a DPOC, doenças de grande impacto socioeconômico, apresentam importante grau de heterogeneidade clínica e freqüentemente ocorrem em concomitância num mesmo paciente. Ou seja, pacientes com DPOC freqüentemente apresentam características de asma e asmáticos fumantes apresentam características da DPOC. Estes fatos tornam muito importantes a determinação acurada do padrão inflamatório dos pacientes que têm asma ou DPOC para um melhor entendimento das relações entre os marcadores biológicos (percentual de eosinófilos no escarro, dosagem de ECP), assim como para avaliar a eficácia de novas estratégias terapêuticas.

Neste sentido, o uso da indução de escarro como um método não-invasivo e reprodutível de monitoração da inflamação das vias aéreas é um grande avanço para a medicina respiratória. A disponibilização de marcadores no escarro permitirá uma melhor caracterização da gravidade das doenças das vias aéreas, a avaliação do controle das doenças, a predição da resposta ao tratamento e o desenvolvimento de estratégias de seleção de fenótipos ou sub-fenótipos de pacientes apresentando padrões biológicos e clínicos específicos.

### 3- OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Descrever as características citológicas do escarro induzido de adultos hígidos em Florianópolis

#### 3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Avaliar as diferenças na celularidade do escarro induzido em relação às faixas etárias

3.2.2 Investigar a celularidade total e diferencial de acordo com a presença de atopia

### 3. Celularidade do escarro induzido de acordo com a faixa etária e com a presença ou ausência de atopia.

A análise da contagem celular total e diferencial (expressa em percentual) foi similar nas diferentes faixas etárias estudadas (Tabela 4).

Tabela 4. Contagem celular total e diferencial\* no escarro induzido, de acordo com a faixa etária

Idade	18-29	30-39	40-49	≥50
n	39	12	13	24
CCT x10 <sup>6</sup> /g	4.1 ± 3.2	5.3 ± 4.3	5.2 ± 3.7	5.8 ± 5.6
Eosinófilos	0.1 ± 0.3	0.08 ± 0.3	0.2 ± 0.4	0.08 ± 0.3
Neutrófilos	20.2 ± 14.5	29.0 ± 14.8	28.1 ± 11.1	23.1 ± 14.8
Macrófagos	73.0 ± 14.8	62.3 ± 11.2	64.5 ± 10.6	66.0 ± 16.5
Linfócitos	3.1 ± 2.5	3.3 ± 2.5	3.0 ± 2.1	3.0 ± 2.6
Células broncoepiteliais	4.3 ± 5.3	5.3 ± 4.4	4.2 ± 4.6	7.2 ± 12.7

\*Valores expressos como média e desvio padrão

CCT = contagem celular total

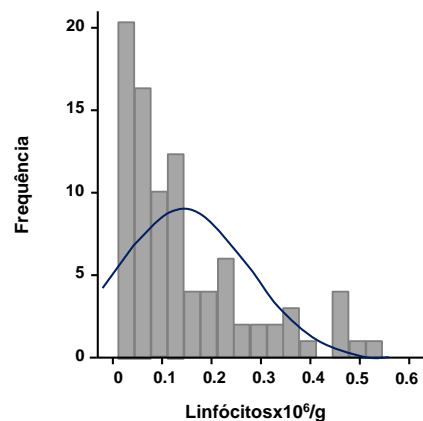


Figura 9. Histograma da contagem do número de linfócitos por grama de escarro induzido

#### 4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Simpson, J.L., P. McElduff, and P.G. Gibson, Assessment and Reproducibility of Non-Eosinophilic Asthma Using Induced Sputum. *Respiration*, 2009.
2. Bartoli, M.L., et al., Biological markers in induced sputum of patients with different phenotypes of chronic airway obstruction. *Respiration*, 2009. 77(3): p. 265-72.
3. Kim, C.K., Y.Y. Koh, and Z. Callaway, The validity of induced sputum and bronchoalveolar lavage in childhood asthma. *J Asthma*, 2009. 46(2): p. 105-12.
4. Djukanovic, R., et al., Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J Suppl*, 2002. 37: p. 1s-2s.
5. Bacci, E., et al., Induced sputum is a reproducible method to assess airway inflammation in asthma. *Mediators Inflamm*, 2002. 11(5): p. 293-8.
6. Holz, O., J. Kips, and H. Magnussen, Update on sputum methodology. *Eur Respir J*, 2000. 16(2): p. 355-9.
7. Efthimiadis, A., et al., Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Eur Respir J Suppl*, 2002. 37: p. 19s-23s.
8. Hargreave, F.E. and R. Leigh, Induced sputum, eosinophilic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999. 160(5 Pt 2): p. S53-7.
9. Hargreave, F.E., Induced sputum for the investigation of airway inflammation: evidence for its clinical application. *Can Respir J*, 1999. 6(2): p. 169-74.
10. Drews, A.C., et al., Neutrophilic airway inflammation is a main feature of induced sputum in nonatopic asthmatic children. *Allergy*, 2009. 64(11): p. 1597-601.
11. Rovina, N., et al., Interleukin-18 in induced sputum: association with lung function in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*, 2009. 103(7): p. 1056-62.
12. Chang, K.C., et al., Supervised and induced sputum among patients with smear-negative pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J*, 2008. 31(5): p. 1085-90.
13. Lahti, E., et al., Induced sputum in the diagnosis of childhood community-acquired pneumonia. *Thorax*, 2009. 64(3): p. 252-7.
14. Jayaram, L., et al., Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice. *Eur Respir J*, 2000. 16(1): p. 150-8.

15. Bickerman, H.A., E.E. Sproul, and A.L. Barach, An aerosol method of producing bronchial secretions in human subjects: a clinical technic for the detection of lung cancer. *Dis Chest*, 1958. 33(4): p. 347-62.
16. Pin, I., et al., Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*, 1992. 47(1): p. 25-9.
17. Fahy, J.V., et al., Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis*, 1993. 147(5): p. 1126-31.
18. Tan, C.W., C.T. Liu, and Y.H. Wu, [The clinical significance of noninvasive inflammatory markers in exhaled breath condensate and induced sputum in persistent asthmatic patients]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2009. 48(4): p. 299-303.
19. Bartoli, M.L., et al., Some factors influencing quality of spontaneous or induced sputum for inflammatory cell analysis. *Monaldi Arch Chest Dis*, 2007. 67(2): p. 81-3.
20. Ward, R., et al., Between-observer repeatability of sputum differential cell counts. Influence of cell viability and squamous cell contamination. *Clin Exp Allergy*, 1999. 29(2): p. 248-52.
21. Pizzichini, E., et al., Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. 154(2 Pt 1): p. 308-17.
22. Hargreave, F.E., E. Pizzichini, and M. Pizzichini, Induced sputum examination. *J Allergy Clin Immunol*, 1998. 101(4 Pt 1): p. 569-70.
23. Freed, A.N., et al., Dry air- and hypertonic aerosol-induced bronchoconstriction and cellular responses in the canine lung periphery. *Eur Respir J*, 1994. 7(7): p. 1308-16.
24. Gravelyn, T.R., P.M. Pan, and W.L. Eschenbacher, Mediator release in an isolated airway segment in subjects with asthma. *Am Rev Respir Dis*, 1988. 137(3): p. 641-6.
25. Pizzichini, M.M., et al., Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. 154(4 Pt 1): p. 866-9.
26. Bhowmik, A., et al., Comparison of spontaneous and induced sputum for investigation of airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 1998. 53(11): p. 953-6.
27. Moodley, Y.P., V. Krishnan, and U.G. Laloo, Neutrophils in induced sputum arise from central airways. *Eur Respir J*, 2000. 15(1): p. 36-40.

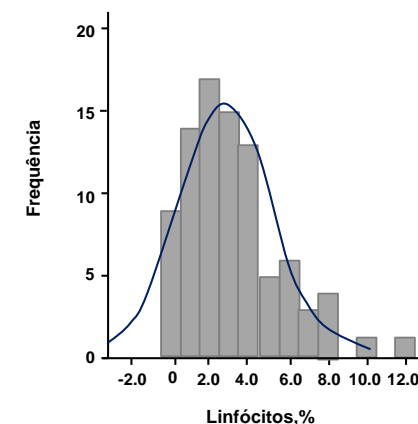


Figura 8. Histograma da contagem percentual de linfócitos no escarro induzido



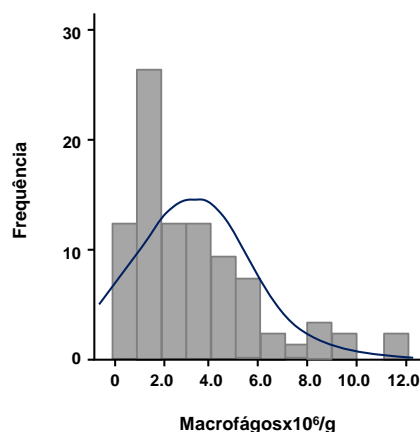


Figura 7. Histograma da contagem do número de macrófagos por grama de escarro induzido

28. Gibson, P.G., et al., Epidemiological association of airway inflammation with asthma symptoms and airway hyperresponsiveness in childhood. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. 158(1): p. 36-41.
29. Wong, H.H. and J.V. Fahy, Safety of one method of sputum induction in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. 156(1): p. 299-303.
30. Hunter, C.J., et al., The safety and success rate of sputum induction using a low output ultrasonic nebuliser. *Respir Med*, 1999. 93(5): p. 345-8.
31. Ilumets, H., et al., Transient elevation of neutrophil proteinases in induced sputum during COPD exacerbation. *Scand J Clin Lab Invest*, 2008: p. 1-6.
32. Hunter, C.J., et al., A comparison of the validity of different diagnostic tests in adults with asthma. *Chest*, 2002. 121(4): p. 1051-7.
33. Pizzichini, M.M., et al., Asthma and natural colds. Inflammatory indices in induced sputum: a feasibility study. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. 158(4): p. 1178-84.
34. Gibson, P.G., Use of induced sputum to examine airway inflammation in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1998. 102(5): p. S100-1.
35. Bacci, E., et al., Comparison between hypertonic and isotonic saline-induced sputum in the evaluation of airway inflammation in subjects with moderate asthma. *Clin Exp Allergy*, 1996. 26(12): p. 1395-400.
36. Popov, T.A., et al., Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J*, 1995. 8(4): p. 559-65.
37. Wark, P.A., et al., Safety of sputum induction with isotonic saline in adults with acute severe asthma. *Clin Exp Allergy*, 2001. 31(11): p. 1745-53.
38. Smith, C.M. and S.D. Anderson, Inhalation provocation tests using nonisotonic aerosols. *J Allergy Clin Immunol*, 1989. 84(5 Pt 1): p. 781-90.
39. Jatakanon, A., et al., An inhaled steroid improves markers of airway inflammation in patients with mild asthma. *Eur Respir J*, 1998. 12(5): p. 1084-8.
40. Chanez, P. and P. Godard, [Analysis of induced sputum in the management of asthma: a valid technique, a service rendered by

- community pneumonologists]. *Rev Mal Respir*, 2002. 19(6): p. 689-91.
41. Paggiaro, P.L., et al., Sputum induction. *Eur Respir J Suppl*, 2002. 37: p. 3s-8s.
  42. Cianchetti, S., et al., Salbutamol pretreatment does not change eosinophil percentage and eosinophilic cationic protein concentration in hypertonic saline-induced sputum in asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy*, 1999. 29(5): p. 712-8.
  43. Jones, P.D., et al., The tolerability, safety, and success of sputum induction and combined hypertonic saline challenge in children. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. 164(7): p. 1146-9.
  44. Holz, O., et al., Changes in sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy*, 1998. 28(3): p. 284-92.
  45. Gershman, N.H., et al., Comparison of two methods of collecting induced sputum in asthmatic subjects. *Eur Respir J*, 1996. 9(12): p. 2448-53.
  46. Gershman, N.H., et al., Fractional analysis of sequential induced sputum samples during sputum induction: evidence that different lung compartments are sampled at different time points. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. 104(2 Pt 1): p. 322-8.
  47. Palomino, A.L., et al., [Induced sputum in children and adolescents with asthma: safety, clinical applicability and inflammatory cells aspects in stable patients and during exacerbation]. *J Pediatr (Rio J)*, 2005. 81(3): p. 216-24.
  48. Spanevello, A., et al., Induced sputum cellularity. Reference values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. 162(3 Pt 1): p. 1172-4.
  49. Belda, J., et al., Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. 161(2 Pt 1): p. 475-8.
  50. Efthimiadis, A., et al., Induced sputum cell and fluid-phase indices of inflammation: comparison of treatment with dithiothreitol vs phosphate-buffered saline. *Eur Respir J*, 1997. 10(6): p. 1336-40.
  51. Belda, J., et al., [Induced sputum in asthma: study of validity and repeatability]. *Arch Bronconeumol*, 1997. 33(7): p. 325-30.
  52. Pavord, I.D., et al., The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax*, 1997. 52(6): p. 498-501.
  53. Louis, R., et al., The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. 161(1): p. 9-16.

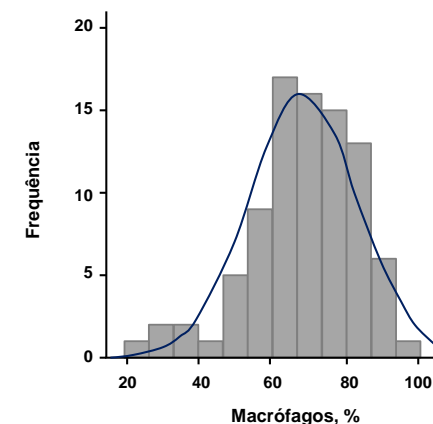


Figura 6. Histograma da contagem percentual de macrófagos no escarro induzido

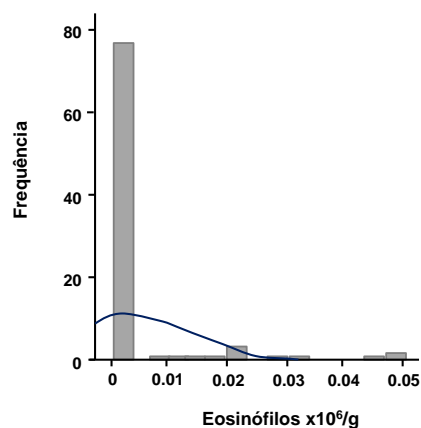


Figura 5. Histograma da contagem do número de eosinófilos por grama de escarro induzido

54. Louis, R. and V. Potmans, [Analysis of induced sputum in refractory asthma]. *Presse Med*, 2008. 37(1 Pt 2): p. 155-9.
55. Pavord, I.D., et al., Clinical applications of assessment of airway inflammation using induced sputum. *Eur Respir J Suppl*, 2002. 37: p. 40s-43s.
56. Green, R.H., et al., Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*, 2002. 57(10): p. 875-9.
57. Green, R.H., et al., Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002. 360(9347): p. 1715-21.
58. Fahy, J.V., et al., Markers of mucus secretion and DNA levels in induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis*, 1993. 147(5): p. 1132-7.
59. Brightling, C.E., et al., Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2000. 356(9240): p. 1480-5.
60. Thomas, R.A., et al., The influence of age on induced sputum differential cell counts in normal subjects. *Chest*, 2004. 126(6): p. 1811-4.
61. Oliveira, G.M., et al., Induced sputum in HIV- infected patients: diagnosis of acute pulmonary diseases. *Rev Assoc Med Bras*, 2009. 55(5): p. 617-20.
62. Nobutomo, K., Air pollution and cytological changes in sputum. *Lancet*, 1978. 1(8063): p. 523-6.
63. Farone, A., et al., Airway neutrophilia and chemokine mRNA expression in sulfur dioxide-induced bronchitis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995. 12(3): p. 345-50.
64. Frampton, M.W., et al., Effects of ozone on normal and potentially sensitive human subjects. Part III: Mediators of inflammation in bronchoalveolar lavage fluid from nonsmokers, smokers, and asthmatic subjects exposed to ozone: a collaborative study. *Res Rep Health Eff Inst*, 1997(78): p. 73-9; discussion 81-99.

## CAPÍTULO II

### MÉTODOS

#### 2.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo descritivo, tipo transversal consistindo de uma única visita.

#### 2.2 LOCAL DO ESTUDO

O presente estudo foi realizado nos Laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas (NUPAIVA) localizado no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### 2.3 TAMANHO DA AMOSTRA

O cálculo da amostra foi baseada em uma estimativa da contagem de eosinófilos no escarro induzido de uma população adulta com precisão de  $\pm 1.0\%$ . Resultados de estudos prévios estimaram em 0,6% o percentual de eosinófilos no escarro induzido da população saudável (29, 49, 50). Assim, para um alfa de 0.05 com poder do estudo de 80%, uma amostra de 88 indivíduos, após eventuais insucessos na indução do escarro e/ou perdas, seria suficiente para atender os objetivos do estudo.

#### 2.4 PARTICIPANTES

Foram recrutados, a partir da mídia local e divulgação nas universidades localizadas na cidade de Florianópolis, 99 adultos hígidos que preenchiam todos os critérios de inclusão abaixo e que não apresentavam nenhum critério de exclusão.

##### 2.4.1. Critérios de inclusão:

- (1) Compreender e concordar em participar do estudo assinando o consentimento livre e esclarecido (TCLE).
- (2) Idade igual ou superior a 18 anos.
- (3) Residir em Florianópolis por pelo menos dois anos;
- (4) Ter espirometria normal com um volume expiratório forçado no primeiro segundo ( $VEF_1$ ) ( $VEF > 80\%$  do previsto) e uma razão de  $VEF_1$  sobre a capacidade vital forçada [ $VEF_1/CVF$ ]  $\geq 75\%$ ).
- (5) Ter teste de broncoprovocação com metacolina normal definido como um teste com uma concentração provocadora de metacolina para causar uma redução de 20% no  $VEF_1$  ( $PC_{20}$ ) superior a 8 mg/ml.

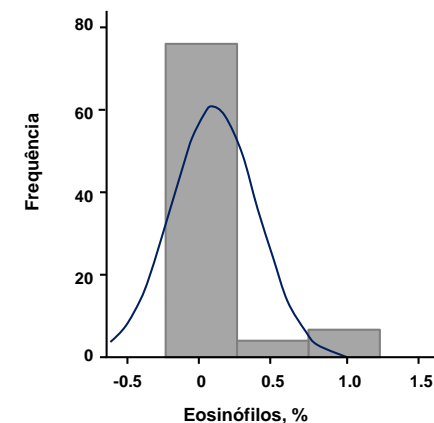


Figura 4. Histograma da contagem percentual de eosinófilos no escarro induzido

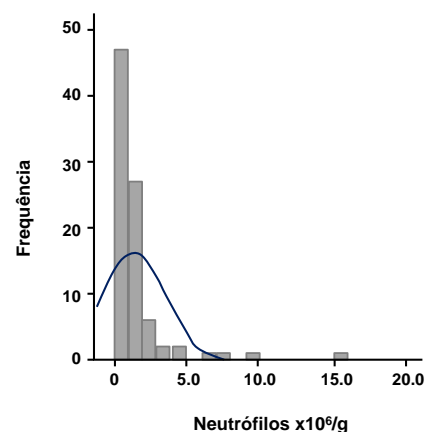


Figura 3. Histograma da contagem do número de neutrófilos por grama de escarro induzido

#### 2.4.2. Critérios de exclusão:

- (1) Portadores de qualquer doença respiratória crônica presente ou no passado.
- (2) Qualquer doença importante com necessidade de tratamento contínuo com medicamentos.
- (3) Ter sido fumante em algum momento da vida
- (4) Ter exposição ocupacional à poeira, produtos químicos
- (5) Ter tido sintomas de gripe, resfriado ou outra infecção respiratória nos últimos 30 dias anteriores à coleta do escarro

#### 2.5. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi considerado ético e metodologicamente adequado, de acordo com as Diretrizes e normas Regulamentares de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96), do conselho Nacional de Saúde. Foi aprovado pelo comitê de Ética e Pesquisa da UFSC em dezembro de 2009 sob ofício 084/84 (ANEXO I). Todos os participantes assinaram o consentimento livre informado (ANEXO II).

#### 2.6 MEDIDAS E PROCEDIMENTOS

O presente estudo consistiu de uma única visita do voluntário na qual foram realizados os seguintes procedimentos:

- (a) Registro em um formulário estruturado contendo informações sócio-demográficas (idade, sexo, etnia, peso, estatura, estado civil, grau de instrução).
- (b) Avaliação das características clínicas (tempo de diagnóstico, medicamentos em uso, co-morbididades, ocorrência de infecções respiratórias dentro de trinta dias antecedendo o estudo).
- (c) Realização de teste cutâneo, espirometria completa pré broncodilatador, teste de broncoprovocação com metacolina e indução do escarro.

##### 2.6.1. Espirometria

Espirometria pré-broncodilatador foi realizada de acordo com as especificações da *American Thoracic Society* (63) em um espirômetro computadorizado (*Koko Spirometer*, PDS Instrumentation, Louisville, EUA). Para tanto foi registrado como VEF<sub>1</sub> basal o melhor entre três valores reprodutíveis, em curvas aceitáveis, e com amplitude inferior a 5%.

##### 2.6.2. Teste cutâneo

Teste cutâneo de alergia foi realizado pela técnica de punção modificada (41) usando 19 extratos alergênicos inalatórios comuns (ácaros, insetos, fungos, *blomis tropicalis*, *periplaneta americana*, blatela germânica, *dermatophagoides pteronyssinus*, *culex pipens*, *dermatophagoides farinae*). A leitura foi feita após 15 minutos, registrando-se o diâmetro médio da circunferência em milímetros. Atopia foi definida pela presença de um ou mais testes cutâneos com um diâmetro de endureção 2 mm maior do que o resultado do controle negativo (64).

#### 2.6.3. Teste de broncoprovocação com metacolina

Teste de broncoprovocação com metacolina foi administrado de acordo com o método descrito por Juniper *et al.* (65). O aerossol de metacolina foi gerado por um nebulizador Jet do tipo Wright®, com um débito de 0.13 ml/min. e partículas com diâmetro aerodinâmico de massa mediano de 1.3  $\mu$ m. Em síntese, o procedimento consistiu da inalação de um aerossol de solução salina isotônica (0.9%) por dois minutos, seguida a cada intervalo de 5 minutos da inalação de doses dobradas de metacolina (disponíveis na concentração de 0.03 a 8.0 mg/ml). Após cada período de inalação, foi realizada uma medida de VEF<sub>1</sub>, aos 30 e 90 segundos, e depois, se necessário, a cada um minuto até que o VEF<sub>1</sub> estabilizasse. A mudança percentual no VEF<sub>1</sub> foi determinada a partir do menor valor do VEF<sub>1</sub> pós-salina e depois do menor valor após cada dose de metacolina em relação ao valor basal. O teste prosseguiu até que ocorresse uma queda no FEV<sub>1</sub> igual ou superior a 20% do VEF<sub>1</sub> basal. Os resultados foram expressos através da CP<sub>20</sub> em unidades não cumulativas. Após o teste, a reversibilidade da broncoconstricção provocada foi comprovada 15 minutos após a inalação de 200  $\mu$ g de salbutamol liberados por um dispositivo pressurizado com dose medida e administrados com auxílio de um espaçador (Aerochamber®, Trudell Medical International, London).

#### 2.6.4. Indução do escarro

A indução de escarro foi realizada pelo método descrito por Pizzichini *et al.* (21). Resumidamente, o procedimento foi iniciado 15 minutos após a administração de 200  $\mu$ g de salbutamol inalado, pela inalação de um aerosol de solução salina em concentrações crescentes de 3%, 4% e 5%, cada uma destas inalada por 7 minutos sucessivamente até a última concentração ou até uma queda do volume expirado no primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>) igual ou superior a 20% em relação ao valor

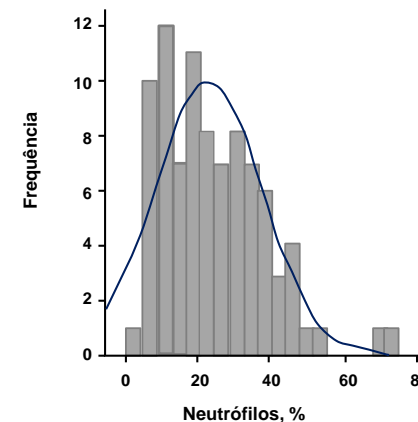


Figura 2. Histograma da contagem percentual de neutrófilos no escarro induzido

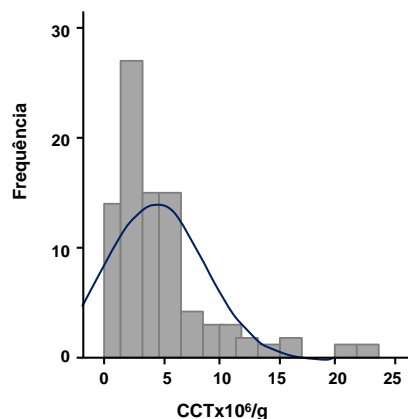


Figura 1. Histograma da contagem celular total (CCT) x 10<sup>6</sup> no escarro induzido

basal. Para a nebulização da solução salina foi utilizado um nebulizador ultrasônico Fisoneb (*Fisons*, Pickering, Ontario, Canadá), com débito de 0,87 ml/min e partículas com diâmetro aerodinâmico de massa mediano de 5,58  $\mu$ m. Após cada período de inalação, o VEF<sub>1</sub> foi medido para garantir a segurança do teste, sendo que a concentração da solução salina não foi aumentada caso ocorresse uma queda do VEF<sub>1</sub>  $\geq$  10% em relação ao valor basal.

#### 2.6.5. Processamento e análise do escarro

O escarro foi processado e analisado dentro das primeiras 2 horas, conforme descrito por Pizzichini *et al.* (66). Uma amostra de escarro adequada para análise foi definida como aquela que contivesse material expectorado com viabilidade celular superior a 50%, e com uma contaminação com células escamosas da orofaringe inferior a 20% e que se mostrasse suficiente para a contagem diferencial de 400 células.

#### 2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis categóricas (gênero, raça, atopia, sucesso na indução, viabilidade do escarro) estão representadas através de frequência absoluta e percentagens. As variáveis contínuas foram inicialmente avaliadas quanto a critérios de normalidade. As variáveis com distribuição contínua (idade, peso, altura, VEF<sub>1</sub> basal, VEF<sub>1</sub>/CVF, VEF<sub>1</sub> pós-salbutamol) estão expressas como média, desvio padrão ou valor mínimo e máximo. Devido à distribuição não gaussiana da contagem celular total e de alguns componentes celulares (eosinófilos e linfócitos) os resultados da citologia do escarro encontram-se expressos como média e desvio padrão, mediana, intervalo interquartil além dos Percentis (10 e 90). Diferenças entre grupos foram analisadas usando ANOVA ou teste *t* de student para amostras não pareadas. Foram considerados significativos os valores de *p* inferiores a 0.05. Para se testar a aderência à normalidade, utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov.

Os dados foram analisados através do pacote estatístico SPSS-*Statistical Package for the Social Sciences* para Windows, versão 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

## 2.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Simpson JL, McElduff P, Gibson PG. Assessment and Reproducibility of Non-Eosinophilic Asthma Using Induced Sputum. *Respiration*. 2009 Oct 8.
2. Bartoli ML, Di Franco A, Vagaggini B, Bacci E, Cianchetti S, Dente FL, et al. Biological markers in induced sputum of patients with different phenotypes of chronic airway obstruction. *Respiration*. 2009;77(3):265-72.
3. Kim CK, Koh YY, Callaway Z. The validity of induced sputum and bronchoalveolar lavage in childhood asthma. *J Asthma*. 2009 Mar;46(2):105-12.
4. Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep;37:1s-2s.
5. Bacci E, Cianchetti S, Carnevali S, Bartoli ML, Dente FL, Di Franco A, et al. Induced sputum is a reproducible method to assess airway inflammation in asthma. *Mediators Inflamm*. 2002 Oct;11(5):293-8.
6. Holz O, Kips J, Magnussen H. Update on sputum methodology. *Eur Respir J*. 2000 Aug;16(2):355-9.
7. Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, Kelly MM, Linden M, Louis R, et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep;37:19s-23s.
8. Hargreave FE, Leigh R. Induced sputum, eosinophilic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Nov;160(5 Pt 2):S53-7.
9. Hargreave FE. Induced sputum for the investigation of airway inflammation: evidence for its clinical application. *Can Respir J*. 1999 Mar-Apr;6(2):169-74.
10. Drews AC, Pizzichini MM, Pizzichini E, Pereira MU, Pitrez PM, Jones MH, et al. Neutrophilic airway inflammation is a main feature of induced sputum in nonatopic asthmatic children. *Allergy*. 2009 Nov;64(11):1597-601.
11. Rovina N, Dima E, Gerassimou C, Kollintza A, Gratzou C, Roussos C. Interleukin-18 in induced sputum: association with lung function in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2009 Jul;103(7):1056-62.

Tabela 3. Citologia diferencial do escarro induzido expressa em percentual

	Média ±DP	Amplitude normal		Mediana (IQR)	Percentis	
		Média	Média		10	90
		-2DP	+2DP			
Eosinófilos	0.01 ± 0.03	-0.06	0.07	0 (0)	0	0.5
Neutrófilos	23.4 ± 14.3	-5.2	52.8	21.7 (21)	6.9	41.3
Macrófagos	68.4 ± 14.7	39.0	97.8	71.0 (17.9)	47.9	86.0
Linfócitos	3.1 ± 2.4	-1.4	7.9	3.0 (3.0)	0	6.5
Células broncoepiteliais	5.2 ± 7.9	-10.6	21.0	2.8 (4.9)	0.5	13.3

Cél . = células, DP = desvio padrão

As figuras 1 a 9 representam histogramas mostrando a distribuição da contagem celular diferencial expressa em percentuais e em números absolutos por grama de escarro.



As amostras de escarro obtidas possuíam boa viabilidade como indicado pela média de 77.5 % (desvio padrão 11.1) de células viáveis e estavam minimamente contaminadas por saliva uma vez que amostras com contaminação por células escamosas superior a 20% foram consideradas inadequadas. O resultado da contagem total e diferencial do escarro induzido demonstrou que estas eram originárias das vias aéreas inferiores conforme indicado pela presença majoritária de macrófagos e células bronco-epiteliais bem como pela ausência de células escamosas (Tabelas 2 e 3). Além disto, os resultados demonstram que o escarro induzido em indivíduos saudáveis é composto predominantemente por macrófagos seguindo-se de neutrófilos em menor proporção. Eosinófilos foram encontrados infrequentemente.

Tabela 2. Citologia do escarro induzido, total e diferencial, em números absolutos ( $\times 10^6$  células/g)

	Média $\pm$ DP	Amplitude normal		Mediana (IQR)	Percentis	
		Média	Média		10	90
		-2DP	+2DP			
Contagem celular total	4.8 $\pm$ 4.2	-3.6	13.2	3.5 (4.0)	1.2	10.8
Eosinófilos	0.004 $\pm$ 0.01	-0.016	0.024	0 (0)	0	0.02
Neutrófilos	1.4 $\pm$ 2.1	-2.8	5.6	0.9 (1.4)	0.1	3.0
Macrófagos	3.2 $\pm$ 2.5	-1.8	8.2	2.3 (3.0)	0.6	6.8
Linfócitos	0.1 $\pm$ 0.1	-0.1	0.3	0.09 (0.2)	0	0.3
Células broncoepiteliais	0.1 $\pm$ 0.1	-0.1	0.3	0.1 $\pm$ 0.1	0.01	0.3

DP = desvio padrão

12. Chang KC, Leung CC, Yew WW, Tam CM. Supervised and induced sputum among patients with smear-negative pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J*. 2008 May;31(5):1085-90.
13. Lahti E, Peltola V, Waris M, Virkki R, Rantakokko-Jalava K, Jalava J, et al. Induced sputum in the diagnosis of childhood community-acquired pneumonia. *Thorax*. 2009 Mar;64(3):252-7.
14. Jayaram L, Parameswaran K, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice. *Eur Respir J*. 2000 Jul;16(1):150-8.
15. Bickerman HA, Sproul EE, Barach AL. An aerosol method of producing bronchial secretions in human subjects: a clinical technic for the detection of lung cancer. *Dis Chest*. 1958 Apr;33(4):347-62.
16. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*. 1992 Jan;47(1):25-9.
17. Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis*. 1993 May;147(5):1126-31.
18. Tan CW, Liu CT, Wu YH. [The clinical significance of noninvasive inflammatory markers in exhaled breath condensate and induced sputum in persistent asthmatic patients]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2009 Apr;48(4):299-303.
19. Bartoli ML, Bacci E, Cianchetti S, Dente FL, Di Franco A, Vagaggini B, et al. Some factors influencing quality of spontaneous or induced sputum for inflammatory cell analysis. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2007 Jun;67(2):81-3.
20. Ward R, Woltmann G, Wardlaw AJ, Pavord ID. Between-observer repeatability of sputum differential cell counts. Influence of cell viability and squamous cell contamination. *Clin Exp Allergy*. 1999 Feb;29(2):248-52.
21. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Aug;154(2 Pt 1):308-17.
22. Hargreave FE, Pizzichini E, Pizzichini M. Induced sputum examination. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Apr;101(4 Pt 1):569-70.
23. Freed AN, Omori C, Hubbard WC, Adkinson NF, Jr. Dry air- and hypertonic aerosol-induced bronchoconstriction and cellular

responses in the canine lung periphery. Eur Respir J. 1994 Jul;7(7):1308-16.

24. Gravelyn TR, Pan PM, Eschenbacher WL. Mediator release in an isolated airway segment in subjects with asthma. Am Rev Respir Dis. 1988 Mar;137(3):641-6.

25. Pizzichini MM, Popov TA, Efthimiadis A, Hussack P, Evans S, Pizzichini E, et al. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. Am J Respir Crit Care Med. 1996 Oct;154(4 Pt 1):866-9.

26. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Devalia JL, Wedzicha JA. Comparison of spontaneous and induced sputum for investigation of airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. Thorax. 1998 Nov;53(11):953-6.

27. Moodley YP, Krishnan V, Laloo UG. Neutrophils in induced sputum arise from central airways. Eur Respir J. 2000 Jan;15(1):36-40.

28. Gibson PG, Wlodarczyk JW, Hensley MJ, Gleeson M, Henry RL, Cripps AW, et al. Epidemiological association of airway inflammation with asthma symptoms and airway hyperresponsiveness in childhood. Am J Respir Crit Care Med. 1998 Jul;158(1):36-41.

29. Wong HH, Fahy JV. Safety of one method of sputum induction in asthmatic subjects. Am J Respir Crit Care Med. 1997 Jul;156(1):299-303.

30. Hunter CJ, Ward R, Woltmann G, Wardlaw AJ, Pavord ID. The safety and success rate of sputum induction using a low output ultrasonic nebuliser. Respir Med. 1999 May;93(5):345-8.

31. Ilumets H, Ryttilä PH, Sovijärvi AR, Tervahartiala T, Myllärniemi M, Sorsa TA, et al. Transient elevation of neutrophil proteinases in induced sputum during COPD exacerbation. Scand J Clin Lab Invest. 2008 Apr 9:1-6.

32. Hunter CJ, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ, Pavord ID. A comparison of the validity of different diagnostic tests in adults with asthma. Chest. 2002 Apr;121(4):1051-7.

33. Pizzichini MM, Pizzichini E, Efthimiadis A, Chauhan AJ, Johnston SL, Hussack P, et al. Asthma and natural colds. Inflammatory indices in induced sputum: a feasibility study. Am J Respir Crit Care Med. 1998 Oct;158(4):1178-84.

34. Gibson PG. Use of induced sputum to examine airway inflammation in childhood asthma. J Allergy Clin Immunol. 1998 Nov;102(5):S100-1.

35. Bacci E, Cianchetti S, Paggiaro PL, Carnevali S, Bancalari L, Dente FL, et al. Comparison between hypertonic and isotonic saline-

### CAPITULO III

#### RESULTADOS

##### 1. Características dos participantes

Um total de 99 adultos hígidos foram incluídos no estudo. Destes, obteve-se amostra satisfatória de escarro induzido em 88, gerando uma taxa de sucesso de 88,9%. Onze indivíduos foram incapazes de produzir escarro e foram excluídos da análise.

Houve predominância de voluntários do sexo feminino (55,7%) e da faixa etária de adultos jovens com idade entre 18 aos 30 anos (44,3%). Atopia estava presente em um terço dos participantes. As características dos participantes encontram-se descritas na tabela 1.

Tabela 1: Características dos participantes (n= 88)

Idade, anos*	36.9 (19-68)
Gênero masculino, n (%)	39 (44.3)
Atopia, n (%)	27 (30.7)
Índice de Massa Corporal *	23.7 (23.1;24.5)
VEF <sub>1</sub> pré BD, % do previsto*	98.5 (96.2;100.9)
VEF <sub>1</sub> / CVF pré BD, %*	82.4 (81.2;83.8)

n = número de participantes

Atopia significa um ou mais testes cutâneo por puntura positivo, com diâmetro de enduração 2mm maior que o controle negativo

\*Resultados expressos em média e intervalo de 95% de confiança

VEF<sub>1</sub> = Volume expiratório forçado no primeiro segundo

BD = broncodilatador

CVF = Capacidade vital forçada

##### 2. Celularidade do escarro induzido em todos os participantes

70. Nobutomo K. Air pollution and cytological changes in sputum. *Lancet*. 1978 Mar 11;1(8063):523-6.
71. Fahy JV, Wong HH, Liu JT, Boushey HA. Analysis of induced sputum after air and ozone exposures in healthy subjects. *Environ Res*. 1995 Aug;70(2):77-83.
72. Lewis JA, Rao KM, Castranova V, Vallyathan V, Dennis WE, Knechtges PL. Proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid: effect of acute exposure to diesel exhaust particles in rats. *Environ Health Perspect*. 2007 May;115(5):756-63.
73. Nordenhall C, Pourazar J, Blomberg A, Levin JO, Sandstrom T, Adelroth E. Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum. *Eur Respir J*. 2000 Jun;15(6):1046-51.
74. Simpson JL, McElduff P, Gibson PG. Assessment and reproducibility of non-eosinophilic asthma using induced sputum. *Respiration*. 2010;79(2):147-51.
75. Liu QQ, Chen SH, Liang MB, Feng LY. Induced sputum eosinophil count for the diagnosis of bronchial asthma. *Saudi Med J*. 2010 Jun;31(6):710-2.
76. Alvarez M, Uribe P, Echegoyen A, Almudevar E, Olaguibel J, Urbiola E. [Eosinophils in induced sputum versus nitric oxide in exhaled air: clinical utility in bronchial asthma.]. *An Sist Sanit Navar*. 2009 May-Aug;32(2):217-25.
77. Boersma M, Lutter R, van de Pol MA, Out TA, Jansen HM, Jonkers RE. Repeatability of inflammatory parameters in induced sputum of COPD patients. *COPD*. 2007 Dec;4(4):321-9.
78. O'Byrne PM, Inman MD. Induced sputum to assess airway inflammation in asthma. *Eur Respir J*. 1996 Dec;9(12):2435-6.
79. Kips JC, Inman MD, Jayaram L, Bel EH, Parameswaran K, Pizzichini MM, et al. The use of induced sputum in clinical trials. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep;37:47s-50s.

- induced sputum in the evaluation of airway inflammation in subjects with moderate asthma. *Clin Exp Allergy*. 1996 Dec;26(12):1395-400.
36. Popov TA, Pizzichini MM, Pizzichini E, Kolendowicz R, Punthakee Z, Dolovich J, et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J*. 1995 Apr;8(4):559-65.
37. Wark PA, Simpson JL, Hensley MJ, Gibson PG. Safety of sputum induction with isotonic saline in adults with acute severe asthma. *Clin Exp Allergy*. 2001 Nov;31(11):1745-53.
38. Smith CM, Anderson SD. Inhalation provocation tests using nonisotonic aerosols. *J Allergy Clin Immunol*. 1989 Nov;84(5 Pt 1):781-90.
39. Jatakanon A, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. An inhaled steroid improves markers of airway inflammation in patients with mild asthma. *Eur Respir J*. 1998 Nov;12(5):1084-8.
40. Chanez P, Godard P. [Analysis of induced sputum in the management of asthma: a valid technique, a service rendered by community pneumonologists]. *Rev Mal Respir*. 2002 Dec;19(6):689-91.
41. Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukanovic R, Maestrelli P, et al. Sputum induction. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep;37:3s-8s.
42. Cianchetti S, Bacci E, Ruocco L, Bartoli ML, Carnevali S, Dente FL, et al. Salbutamol pretreatment does not change eosinophil percentage and eosinophilic cationic protein concentration in hypertonic saline-induced sputum in asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy*. 1999 May;29(5):712-8.
43. Jones PD, Hankin R, Simpson J, Gibson PG, Henry RL. The tolerability, safety, and success of sputum induction and combined hypertonic saline challenge in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Oct 1;164(7):1146-9.
44. Ezeamuzie CI, Shihab PK. Interactions between theophylline and salbutamol on cytokine release in human monocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. Jul;334(1):302-9.
45. Holz O, Jorres RA, Koschik S, Speckin P, Welker L, Magnussen H. Changes in sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy*. 1998 Mar;28(3):284-92.
46. Gershman NH, Wong HH, Liu JT, Mahlmeister MJ, Fahy JV. Comparison of two methods of collecting induced sputum in asthmatic subjects. *Eur Respir J*. 1996 Dec;9(12):2448-53.

47. Gershman NH, Liu H, Wong HH, Liu JT, Fahy JV. Fractional analysis of sequential induced sputum samples during sputum induction: evidence that different lung compartments are sampled at different time points. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Aug;104(2 Pt 1):322-8.
48. Palomino AL, Bussamra MH, Saraiva-Romanholo BM, Martins MA, Nunes Mdo P, Rodrigues JC. [Induced sputum in children and adolescents with asthma: safety, clinical applicability and inflammatory cells aspects in stable patients and during exacerbation]. *J Pediatr (Rio J)*. 2005 May-Jun;81(3):216-24.
49. Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, Romano F, Balzano G, Migliori GB, et al. Induced sputum cellularity. Reference values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Sep;162(3 Pt 1):1172-4.
50. Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Feb;161(2 Pt 1):475-8.
51. Efthimiadis A, Pizzichini MM, Pizzichini E, Dolovich J, Hargreave FE. Induced sputum cell and fluid-phase indices of inflammation: comparison of treatment with dithiothreitol vs phosphate-buffered saline. *Eur Respir J*. 1997 Jun;10(6):1336-40.
52. Belda J, Giner J, Casan P, Sanchis J. [Induced sputum in asthma: study of validity and repeatability]. *Arch Bronconeumol*. 1997 Jul-Aug;33(7):325-30.
53. Pavord ID, Pizzichini MM, Pizzichini E, Hargreave FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax*. 1997 Jun;52(6):498-501.
54. Louis R, Lau LC, Bron AO, Roldaan AC, Radermecker M, Djukanovic R. The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Jan;161(1):9-16.
55. Louis R, Potmans V. [Analysis of induced sputum in refractory asthma]. *Presse Med*. 2008 Jan;37(1 Pt 2):155-9.
56. Pavord ID, Sterk PJ, Hargreave FE, Kips JC, Inman MD, Louis R, et al. Clinical applications of assessment of airway inflammation using induced sputum. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep;37:40s-3s.
57. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*. 2002 Oct;57(10):875-9.
58. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002 Nov 30;360(9347):1715-21.

59. Fahy JV, Steiger DJ, Liu J, Basbaum CB, Finkbeiner WE, Boushey HA. Markers of mucus secretion and DNA levels in induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis*. 1993 May;147(5):1132-7.
60. Brightling CE, Monteiro W, Ward R, Parker D, Morgan MD, Wardlaw AJ, et al. Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2000 Oct 28;356(9240):1480-5.
61. Thomas RA, Green RH, Brightling CE, Birring SS, Parker D, Wardlaw AJ, et al. The influence of age on induced sputum differential cell counts in normal subjects. *Chest*. 2004 Dec;126(6):1811-4.
62. Oliveira GM, Cordeiro AM, Marsico GA, Renteria JM, Guimaraes CA. Induced sputum in HIV- infected patients: diagnosis of acute pulmonary diseases. *Rev Assoc Med Bras*. 2009 Sep-Oct;55(5):617-20.
63. Standardization of Spirometry, 1994 Update. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Sep;152(3):1107-36.
64. J. P. Skin tests in diagnosis. Gell PGH, Coombs RRD, Lachman PJ, editors *Clinical aspects of immunology* 3rd ed Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1975:55-88.
65. Juniper EF. Histamine and methacholine inhalation tests: a laboratory tidal breathing protocol. AB Draco, Lund, Sweden, 1991.
66. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J*. 1996 Jun;9(6):1174-80.
67. Spanevello A, Beghe B, Bianchi A, Migliori GB, Ambrosetti M, Neri M, et al. Comparison of two methods of processing induced sputum: selected versus entire sputum. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Feb;157(2):665-8.
68. Hiltermann JT, Lapperre TS, van Bree L, Steerenberg PA, Brahm JJ, Sont JK, et al. Ozone-induced inflammation assessed in sputum and bronchial lavage fluid from asthmatics: a new noninvasive tool in epidemiologic studies on air pollution and asthma. *Free Radic Biol Med*. 1999 Dec;27(11-12):1448-54.
69. Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, et al. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Jun 15;165(12):1610-7.